

UNIVERSIDAD DE CUENCA



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Comparación de la ozonoterapia y tratamiento alopático sobre la endometritis subclínica en vacas Holstein mestizas en periodo postparto”

**Tesis de grado previa a la obtención del título de
“Médico Veterinario Zootecnista”**

AUTORES: Manuel Marcel Enríquez Morocho

Hugo Marcelo Maldonado Pauta

DIRECTOR:

Dr. Jhonny Narváez Terán. MgSc.

Cuenca – Ecuador

2017



I RESUMEN

El objetivo de este estudio fue comparar el efecto de la ozonoterapia y un tratamiento alopático sobre la endometritis subclínica (ES) en vacas Holstein en el periodo postparto. La investigación se realizó en tres haciendas del cantón Cuenca: Granjas Nero e Irquis de la Universidad de Cuenca; y una particular, Cumbesa, desde febrero a noviembre del 2016. Se incluyeron vacas multíparas entre los 34 y 47 días postparto (DPP), se les practicó una citología endometrial, aquellas vacas con un porcentaje $\geq 10\%$ de polimorfonucleares (PMNs) se consideró con ES y se dividieron en dos grupos. Se aplicó por vía intrauterina a G1 ($n = 30$) 500mg de cefapirina benzatínica (CB) excipiente c.s.p. 19g y a G2 ($n = 30$) 45 μ g/ml de ozono (O_3) en 60 ml de agua destilada tipo II estéril y un grupo control G3 ($n = 30$) estuvo conformado por vacas con un porcentaje de PMNs $<10\%$ y no recibieron ningún tratamiento. Los datos fueron procesados utilizando un modelo lineal general mixto PROC GLIMIX de SAS 9.3. El porcentaje de PMNs entre los 34 – 47 DPP en G1, G2 y G3 fueron de $16,2 \pm 0,09$; $15,1 \pm 0,09$ y $3,4 \pm 0,19$ respectivamente. Luego de 72 horas se evaluó el efecto de los tratamientos obteniéndose diferencia estadística entre G1= $6,3 \pm 0,04\%$ y G2= $3,2 \pm 0,05\%$ ($P < 0,0001$), y G1 frente a G3 ($2,9 \pm 0,05\%$) ($P < 0,0001$). El intervalo parto celo (IPCe), intervalo parto concepción (IPCo) y el porcentaje de preñez al primer servicio no presentan diferencia estadística entre los tratamientos ($P > 0,05$), sin embargo en G2 se estima mayores ingresos por lactancia (\$13.218,10) en comparación con G1 (\$8.925,06) por mayor porcentaje de preñez al primer servicio (63,3% y 43,3% respectivamente) y por disminución de los costos en el IPCe y IPCo. En conclusión, la administración de O_3 y CB reducen los porcentajes de PMNs entre los 34 a 47 DPP, siendo más eficaz el O_3 y con un impacto económico positivo sobre el performance reproductivo frente a los otros tratamientos en estudio.

Palabras clave: CEFAPIRINA BENZATÍNICA, ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA, OZONO, POLIMORFONUCLEARES



II ABSTRACT

The objective of this study was to compare the effect of ozone therapy and an allopathic treatment on subclinical endometritis (SE) in Holstein cows in the postpartum period. The research was made in three dairy farms of Cuenca: Granja Nero and Granja Irquis of the University of Cuenca; and a private dairy farm, Cumbesa, since February to November 2016. Multiparous cows were selected between 34 and 47 days postpartum (DPP), they were practiced endometrial cytology, the cows with a percentage $\geq 10\%$ of polymorphonuclear (PMNs) were considered with SE and were divided in two groups, they were applied through intrauterine to G1 (n = 30) with 500mg cephapirin benzathine (CB) excipient csp 19g, to G2 (n = 30) with $45\mu\text{g} / \text{ml O}_3$ in 60ml of distilled water sterile type II and in the group 3 (n = 30) was composed of cows with a percentage of PMNs $<10\%$ which did not receive any treatment (control group); the data were processed using a PROC GLIMIX general linear model of SAS 9.3. The percentage of PMNs between 34-47 DPP in G1, G2 and G3 were $16,3 \pm 0,09$; $15,1 \pm 0,09$ and $3,4 \pm 0,19$ respectively, after 72 hours the effect of the treatments was evaluated, obtaining statistical difference between G1 = $6,2 \pm 0,04\%$ and G2 = $3,2 \pm 0,05\%$ ($P < 0,0001$), and G1 vs G3 ($2,9 \pm 0,05\%$) ($P < 0,0001$). The interval between calving (IPCe), interval conception (IPCo) and the percentage of pregnancy at the first service did not present a statistical difference between the treatments ($P > 0.05$), however, in G2 we estimate to obtain higher lactation income (\$ 13.218,10) compared to G1 (\$ 8.925,06) due to a higher percentage of pregnancy to first service (63.3% and 43.3%, respectively) and lower costs in the IPCe and IPCo. In conclusion, the administration of O_3 and CB reduce the percentages of PMNs between 34 and 47 DPP, O_3 being more effective and has a positive economic impact on the reproductive performance compared to the other treatments under study.

Key words: BENZATHINE CEPHAPIRIN, SUBCLINICAL ENDOMETRITIS, OZONE, POLYMORPHONUCLEAR



III INDICE

I RESUMEN	I
II ABSTRACT	II
III INDICE	III
IV INDICE DE TABLAS	VI
V INDICE DE FIGURAS	VII
VI INDICE DE ANEXOS	VIII
1. INTRODUCCION	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo general	2
2.2. Objetivos específicos	2
3. HIPOTESIS	2
4. MARCO TEORICO	3
4.1. Parto	3
4.1.1. Fisiología del parto	3
4.1.2. Puerperio	4
4.1.2.1 Puerperio precoz	4
4.1.2.2 Puerperio intermedio	5
4.1.2.3 Puerperio post ovulación o total	5
4.1.3. Modificaciones fisiológicas durante el puerperio	5
4.1.3.1 Restablecimiento de la forma del cérvix	5
4.1.3.2 Involución uterina	6
4.1.3.3 Flora bacteriana e infección uterina	7
4.1.3.4 Respuesta inflamatoria e inmune del útero postparto	8
4.2. Enfermedades uterinas	9
4.2.1. Clasificación de las enfermedades uterinas	9
4.2.1.1 Endometritis clínica	10
4.2.1.2 Endometritis subclínica	10
4.2.1.2.1 Técnicas de diagnóstico para Endometritis Subclínica	13
4.2.1.2.1.1 Citología endometrial	13
4.2.1.2.1.2 Ultrasonografía	15



4.2.1.2.1.3 Vaginoscopía	16
4.3. Terapias farmacológicas y alternas para endometritis subclínica	16
4.3.1. Tratamiento alopático: Cefapirina benzatínica	17
4.3.1.1 Grupo farmacológico.....	17
4.3.1.2 Farmacodinamia.....	17
4.3.1.3 Parámetros farmacocinéticos	17
4.3.2. Ozonoterapia.....	18
4.3.2.1 Generalidades	18
4.3.2.2 Uso de la ozonoterapia	19
4.3.2.3 Mecanismo de acción.....	20
4.3.2.4 Concentración y dosificación	22
4.4. Impacto económico de la endometritis subclínica sobre la fertilidad en hatos lecheros.....	23
4.4.1. Intervalo parto-celo (IPCe)	24
4.4.2. Intervalo parto concepción al primer servicio (IPCo).....	25
4.4.3. Tasa de concepción al primer servicio	25
5. MATERIALES Y METODOS.....	26
5.1. Materiales	26
5.2. Métodos	26
5.2.1. Selección de animales y diseño experimental	26
5.2.2. Técnica de cytobrush y evaluación citológica	27
5.2.3. Análisis estadístico	28
5.2.4. Análisis económico.....	28
6. RESULTADOS	31
6.1. Efecto de los tratamientos sobre la endometritis subclínica	31
6.2. Efecto de los tratamientos sobre el intervalo parto celo, intervalo parto concepción y porcentaje de preñez	33
6.3. Impacto económico de los tratamientos sobre el intervalo parto celo, intervalo parto concepción y porcentaje de preñez	34
6.3.1. Costo de los tratamientos	34
6.3.2. Impacto económico de los tratamientos sobre el intervalo parto celo.....	36
7. DISCUSIÓN.....	39
7.1. Efecto de los tratamientos sobre la endometritis subclínica	39



7.2. Efecto de los tratamientos sobre el intervalo parto celo, intervalo parto concepción y porcentaje de preñez	40
7.3. Impacto económico de los tratamientos sobre el intervalo parto celo, intervalo parto concepción y porcentaje de preñez	41
8. CONCLUSIONES	44
9. RECOMENDACIONES	45
10. BIBLIOGRAFÍA	46
11. ANEXOS	55



IV INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Resumen de estudios de prevalencia de endometritis subclínica en vacas Holstein.	12
Tabla 2 Comparación de cambios citológicos del tratamiento con PGF2 α y Cefapirina benzatínica entre los 50–60 DPP.	18
Tabla 3 Materiales	26
Tabla 4 Parámetros reproductivos para la determinación del impacto económico de los tratamientos	29
Tabla 5 Características generales del grupo de animales seleccionados	31
Tabla 6 Efecto terapéutico de los tratamientos	32
Tabla 7 Correlación del porcentaje de polimorfonucleares	33
Tabla 8: Efecto de los tratamientos sobre el performance reproductivo	33
Tabla 9 Estructura de costos de los tratamientos	34
Tabla 10 Impacto económico sobre el intervalo parto celo	37
Tabla 11 Impacto económico sobre el intervalo parto concepción	37
Tabla 12 Impacto económico sobre el intervalo parto concepción	38



V INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Procesamiento de muestra endometrial obtenida mediante la técnica de cytobrush	14
Figura 2 Vista microscópica a 400X de muestra endometrial teñida con Giemsa modificada: Polimorfonucleares y células endometriales.....	15
Figura 3 Ecografía de la sección circular del útero.....	15
Figura 4 Mecanismo de acción del ozono como regulador de la síntesis de citosinas.....	21
Figura 5 Representación del efecto bactericida del O_3	22
Figura 6 Diferencia del efecto de los tratamientos.....	32
Figura 7 Estructura de costos de la Cefapirina benzatínica	35
Figura 8 Estructura de costos del tratamiento con agua destilada tipo II ozonificada	35
Figura 9 Estructura de costos del grupo testigo	36



VI INDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Cronograma de actividades	55
Anexo 2 Ubicación de las granjas.....	55
Anexo 3 Evaluación del anillo de Burdi.....	57
Anexo 4 Citología endometrial mediante la técnica de cytobrush	57
Anexo 5 Tinción de Giemsa modificado	58
Anexo 6 Resultados de laboratorio del centro de Diagnóstico de la Facultad de Ciencias Médicas.....	59
Anexo 7 Evaluación de PMNs de las placas citología endometrial.....	61
Anexo 8 Preparación de la solución ozonificada y aplicación de los tratamientos	63
Anexo 9 Promedio de la variable del número de partos	65
Anexo 10 Promedio de la variable de los días postparto.....	65
Anexo 11 Promedio de la variable de anillo de burdi	65
Anexo 12 Promedio de la variable condición corporal	65
Anexo 13 Promedios de la variable polimorfonucleares entre los 34 a 37 días postparto.....	65
Anexo 14 Diferencias de mínimos cuadrados – polimorfonucleares 72 horas post-tratamiento	66
Anexo 15 Pruebas de correlación de pearson de la variable días postparto vs. Polimornucleares pretratamiento	66



Anexo 16 Pruebas de correlación de pearson de la variable condicion corporal vs. Polimornucleares pretratamiento	66
Anexo 17 Pruebas de correlación de pearson de la variable anillo de Burdi vs. Polimornucleares pretratamiento	67
Anexo 18 Diferencias de mínimos cuadrados – Intervalo parto celo	67
Anexo 19 Diferencias de mínimos cuadrados – Intervalo parto concepción	67
Anexo 20 Diferencias de mínimos cuadrados – porcentaje de preñez.....	67
Anexo 21 Plantilla de registro de la hoja de campo para el muestreo de citología endometrial	68
Anexo 22 Plantilla de registro de la hoja de campo para el diagnóstico de preñez	69
Anexo 23 Plantilla de registro de la hoja de laboratorio para la evaluación de PMNs	70
Anexo 24 Datos y fórmulas para el cálculo del intervalo parto concepción	71



Manuel Marcel Enríquez Morocho, autor del Trabajo de Titulación “Comparación de la ozonoterapia y tratamiento alopático sobre la endometritis subclínica en vacas Holstein mestizas en periodo postparto”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Médico Veterinario Zootecnista. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 09 de mayo de 2017

Manuel Marcel Enríquez Morocho

C.I: 140077674-4



Hugo Marcelo Maldonado Pauta, autor del Trabajo de Titulación “Comparación de la ozonoterapia y tratamiento alopático sobre la endometritis subclínica en vacas Holstein mestizas en periodo postparto”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Médico Veterinario Zootecnista. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 09 de mayo de 2017

Hugo Marcelo Maldonado Pauta

C.I: 010358806-7



Manuel Marcel Enríquez Morocho, autor del Trabajo de Titulación "Comparación de la ozonoterapia y tratamiento alopático sobre la endometritis subclínica en vacas Holstein mestizas en periodo postparto", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 09 de mayo de 2017

Manuel Marcel Enríquez Morocho

C.I.: 140077674-4



Hugo Marcelo Maldonado Pauta, autor del Trabajo de Titulación "Comparación de la ozonoterapia y tratamiento alopático sobre la endometritis subclínica en vacas Holstein mestizas en periodo postparto", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 09 de mayo de 2017

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Hugo", is written over a horizontal line.

Hugo Marcelo Maldonado Pauta

C.I.: 010358806-7



AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento fraterno a la Universidad de Cuenca y a la Facultad de Ciencias Agropecuarias, a sus autoridades y grupo de docentes quienes día a día han compartido sus conocimientos y experiencias, contribuyendo a nuestra formación académica, especialmente al Dr. Jhonny Narváez, nuestro director de tesis, por su predisposición y empeño en la ejecución de este trabajo de investigación.

A los estudiantes, que motivados por adquirir nuevos conocimientos y adentrarse en la práctica veterinaria colaboraron en las actividades de campo, durante todo el periodo de investigación.

Al personal del Centro de Diagnóstico y Estudios Biomédicos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cuenca y al Dr. René Guamán que con muy buena voluntad contribuyeron en el desarrollo del trabajo de investigación.



DEDICATORIA

Andrea, Martin y Renata, mi fortaleza

Hugo

A mis padres y hermanos, quienes desde el inicio de la etapa universitaria me apoyaron incondicionalmente y han sido el motor para alcanzar esta meta.

Marcel



1. INTRODUCCION

En los últimos 30 años la selección genética en vacas Holstein Friesian, han alcanzado una ganancia en producción de leche; sin embargo el índice de concepción ha disminuido del 56% al 30 - 40% al primer servicio (Walsh *et al.*, 2011); debido a varias patologías que disminuyen la fertilidad, entre estas las infecciones uterinas. (Yusuf *et al.*, 2010).

Luego del parto, el útero se contamina con bacterias patógenas las primeras semanas y disminuye aproximadamente a los 60 días en condiciones normales (Dini *et al.*, 2015), esta contaminación es inevitable y es normal en el 80-100% de las vacas (Walsh *et al.*, 2011). La endometritis subclínica (ES) es una inflamación endometrial crónica que se presenta entre los 21 y 47 días posteriores a la recuperación histológica del endometrio (Dini *et al.*, 2015a), puede ser diagnosticada a partir de la quinta semana postparto mediante citología endometrial (Sheldon *et al.*, 2009). La ES afecta el performance reproductivo en hatos lecheros, por lo que varias investigaciones se encaminan a disminuir el impacto negativo que produce esta afección, buscando mejorar la rentabilidad y la productividad en las ganaderías, sin afectar la salud pública (Plöntzke *et al.*, 2010).

En la actualidad existe varias alternativas de tratamientos para infecciones postparto, donde incluyen antibióticos sistémicos e intrauterinos (Polat *et al.*, 2015), pero el uso desmedido de antibióticos en la industria lechera ha creado conciencia social sobre alimentos seguros e inocuos en los últimos años, por esta razón los veterinarios necesitan buscar alternativas terapéuticas para disminuir su utilización (Ohtsuka *et al.*, 2006).

Actualmente, el ozono es empleado en el tratamiento de patologías del aparato reproductivo en vacas lecheras, mejora su eficiencia, sin dejar residuos en la leche, carne u otros tejidos, no genera resistencia bacteriana, efectos adversos ni reacción anafiláctica. (Đuričić *et al.*, 2015). Con estos antecedentes, en esta investigación, nos planteamos los siguientes objetivos.



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Comparar el efecto de la ozonoterapia y un tratamiento alopático sobre la endometritis subclínica en vacas Holstein mestizas en el periodo postparto.

2.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la ozonoterapia sobre la endometritis subclínica en vacas Holstein mestizas en el periodo postparto.
- Evaluar el efecto de la Cefapirina benzatínica sobre la endometritis en vacas Holstein mestizas en el periodo postparto.
- Evaluar la presencia de PMNs a las 72 horas post tratamiento.
- Determinar el impacto económico de los tratamientos sobre el intervalo parto celo, intervalo parto concepción al primer servicio y porcentaje de concepción al primer servicio.

3. HIPOTESIS

¿El tratamiento con ozono a una dosis de 2,7 mg en 60 ml de solución destilada es eficaz sobre la endometritis subclínica en el periodo postparto de vacas Holstein mestizas?



4. MARCO TEORICO

4.1. Parto

Es el proceso fisiológico por el cual el útero gestante libera al feto y sus anexos del organismo materno, ocurre en el momento del desarrollo, en el que el feto es capaz de vivir fuera del ambiente uterino, su inicio está regulado por factores maternos y fetales (Méo *et al.*, 2000).

4.1.1. Fisiología del parto

Durante la gestación el útero se agranda de forma progresiva a consecuencia del desarrollo fetal, la progesterona es responsable de la quiescencia del miometrio y de mantener el cérvix muy contraído y durante la última etapa de la preñez los estrógenos incrementan el potencial contráctil del útero (Cunningham & Klein, 2009). El feto experimenta estrés debido a una insuficiente nutrición y oxigenación por parte de la placenta, además que la cavidad intrauterina se torna muy reducida en relación al tamaño del feto, estos factores inducen a una maduración acelerada del hipotálamo fetal (Narváez & Lazo, 2008), incrementando la secreción de cortisol fetal que conducen a la síntesis y liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ de las glándulas endometriales, lo que provoca la contracción del miometrio y la dilatación del cérvix para lograr la expulsión del feto (Wattiaux, 1999). El parto consta de tres etapas:

1. **Dilatación del cérvix** en la que el feto se presenta en el orificio interno del cérvix y la actividad miometrial incrementa por la acción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y oxitocina, se extiende entre 2 a 3 horas en multíparas y 4 a 6 horas en primíparas.
2. **Expulsión del feto**, la presencia del feto en el canal pélvico hace que la presión abdominal incremente (*contracciones*) y esta constituye la fuerza principal para que se complete la expulsión del feto (Cunningham & Klein, 2009); su duración varía entre 2 a 10 horas.
3. **Expulsión de las membranas fetales**, las contracciones uterinas persisten y expulsan la placenta, logrando en la mayoría de las vacas entre las 6 – 8 horas posteriores al parto (Wattiaux, 1999).



4.1.2. Puerperio

En este periodo existe inactividad ovárica y sexual, antes de la reanudación de la actividad cíclica del ovario (Nogueira *et al.*, 2014). Es un proceso fisiológico del tracto reproductor femenino que inicia luego del parto hasta restablecer las condiciones para una nueva preñez (Dos Santos & Kozicki, 2015), por lo tanto la involución anatómica e histológica del útero debe completarse y el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal debe funcionar perfectamente (Rutter, 2002).

En el desarrollo fisiológico del puerperio se distinguen dos grandes fases:

1. **Primera fase uterina postpartal o secundinación:** Fase conocida como alumbramiento o decíduación, se considera embriológicamente como la finalización verdadera del parto (Rutter, 2002).
2. **Puerperio propiamente dicho (segunda fase de involución uterina postpartal):** Fase en la que el útero regresa a su condición normal pre gestacional y aptitud para una nueva preñez mediante la eliminación, disolución y reabsorción decidual, logrando una evidente disminución del volumen uterino (Narváez & Lazo, 2008), esta fase se divide en tres subfases:
 1. Puerperio temprano o precoz
 2. Puerperio Intermedio
 3. Puerperio post ovulación o total

4.1.2.1 Puerperio precoz

Inicia con la expulsión del feto y la placenta, prolongandose hasta los 14 días postparto (Narváez & Lazo, 2008), en donde el tracto reproductivo sufre cambios funcionales y estructurales, como la regresión de su tamaño, incluyendo ligamentos sacrociáticos y la arteria uterina (Cordova, 2005) y al final de esta etapa la hipófisis adquiere capacidad de respuesta a la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) (Nogueira *et al.*, 2014).



4.1.2.2 Puerperio intermedio

Se considera a partir del día 15 hasta la primera ovulación (Nogueira *et al.*, 2014), generalmente en el ganado lechero Bos Taurus ocurre alrededor del día 25 postparto, este periodo es muy variable, ya que la edad, estado nutricional, población microbiana uterina e incluso el factor mamogénico son determinantes en la primera ovulación (Narváez & Lazo, 2008).

4.1.2.3 Puerperio post ovulación o total

Comprende desde la primera ovulación hasta los 45 días postparto, sin embargo puede extenderse hasta los 52 – 56 días, debido a que la involución de cada uno de los cuernos es diferente (Narváez & Lazo, 2008), se caracteriza por el retorno del útero a su condición normal pre gestacional y reinicio de la ciclicidad ovárica (Nogueira *et al.*, 2014).

4.1.3. Modificaciones fisiológicas durante el puerperio

Durante el puerperio ocurren varias modificaciones uterinas, entre las más importantes tenemos:

4.1.3.1 Restablecimiento de la forma del cérvix

El útero y la cérvix presenta una gran actividad muscular luego del parto y va disminuyendo paulatinamente entre las 42 y 78 horas postparto (Rgutter, 2002; Sheldon, 2004), sin embargo la involución de la cérvix es más lenta que la del útero, como lo sugiere LeBlanc, 2008 que a los 15 DPP el diámetro del cérvix excede el grosor de los cuernos del útero. La involución del cuello uterino se debe principalmente a la reabsorción del edema tisular y a una reducción de los tejidos musculares (Rutter, 2002).

El proceso de involución de la cérvix inicia entre las 4 -16 horas postparto con la disminución progresiva de la luz cervical, a los dos DPP los anillos y pliegues aún no se han reconstruido y permite el pasaje de solo dos dedos a través del lumen cervical



(Rutter, 2002). A los 7 DPP mantiene una lenta reducción del lumen de la cérvix y se evidencia la presencia de los anillos y pliegues, pero difícilmente se puede introducir un dedo; entre los 10 – 14 DPP se evidencia una reapertura del cérvix que generalmente coincide con la primera ovulación, los anillos y pliegues están completamente formados y se completa alrededor del 25 – 30 DPP (Dobson-Hill, 2009a).

4.1.3.2 Involución uterina

La involución uterina ocurre inmediatamente después del parto, sin embargo es evidente a los 3 a 4 DPP concluyendo en condiciones normales entre 38 y 40 días (García *et al.*, 2003), se da en escala logarítmica (Nogueira *et al.*, 2014), es generalmente un proceso séptico (Runciman *et al.*, 2008), en donde incluyen contracciones uterinas, reducción del tamaño uterino, necrosis y desprendimiento de las carúnculas, regeneración del endometrio (Sheldon, 2004), eliminación de la contaminación bacteriana y reactivación de la actividad ovárica (Heppelmann *et al.*, 2013).

Después del desprendimiento de los cotiledones de las carúnculas maternas ocurre vasoconstricción e inicia la necrosis del tejido caruncular, luego de 5 días pierde organización e integridad celular, iniciando el proceso de reparación local del lumen uterino con una nueva capa de epitelio endometrial (Nogueira *et al.*, 2014) la regeneración del endometrio es superficialmente alcanzado alrededor de los 25 DPP, mientras que las capas más profundas lo consiguen entre la 6 – 8 semana postparto (Sheldon, 2004).

Existen factores que retrasan la involución uterina, como por ejemplo distocia, hipocalcemia, retención de placenta, metritis y endometritis; estas alteraciones son importantes debido a que provocan subfertilidad en vacas lecheras (Sheldon, 2004). Por otro lado las bacterias que colonizan el útero liberan endotoxinas que son absorbidos a través de la pared uterina, llegando al plasma sanguíneo entre el 1 y 12 DPP y se mantienen hasta el día 27 DPP. Las endotoxinas son potentes inductores de



sistemas enzimáticos tales como fosfolipasa A2, la ciclooxigenasa-2 y 5-lipoxigenasa que sintetizan prostaglandinas, las cuales afectan negativamente a la involución uterina y la reanudación de la actividad ovárica (Dobson-Hill, 2009b).

Cuando las bacterias asciende fácilmente el tracto genital dentro del útero, liberan lipolisacaridos, citolisina y piolisina, activando las células del endometrio que poseen receptores especializados Toll-like receptors (TLRs), lo cual inicia la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias como factor de necrosis tumoral (FNT), interferón γ , IL-6, IL-1 β y quimiocinas IL-8, óxido nítrico y prostaglandina E₂ que orquestan la movilización células inmunitarios al útero (neutrófilos y macrófagos) (Singh *et al.*, 2008, Bromfield *et al.*, 2015).

4.1.3.3 Flora bacteriana e infección uterina

Durante la gestación normal el útero mantiene un ambiente estéril, pero en el parto la vulva se relaja, el cérvix se dilata facilitando el ingreso de microorganismos patógenos y no patógenos del medio ambiente al lumen uterino (Sheldon, 2004), esta contaminación uterina es inevitable y normal en el 80 – 100% de las vacas en las dos primeras semanas postparto, sin embargo esta contaminación no siempre se relaciona con una enfermedad uterina (Walsh *et al.*, 2011), ya que la cantidad de microorganismos fluctúa constantemente durante las primeras 7 semanas debido a la contaminación, eliminación y recontaminación bacteriana (Sheldon, 2004).

La contaminación de la cavidad uterina se debe diferenciar de una infección uterina, esta última implica la persistencia de bacterias patógenas (*Escherichia coli*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum*) en lumen uterino, su adherencia a la mucosa, colonización, penetración en el epitelio y/o liberación de toxinas bacterianas que permiten el establecimiento de la misma (Azawi, 2008).

Se ha establecido una relación entre los DPP y el grado de colonización de bacterias patógenas, en donde el 78% de úteros son colonizados entre los 16 – 30 DPP, el 50% entre los 31 – 45 DPP y por otro lado solo el 9% de los úteros son colonizados entre los 46 – 60 DPP (Sheldon, 2004). La presencia de estas bacterias patógenas en el



lumen uterino causan inflamación, lesiones histológicas del endometrio, retraso en la involución uterina y perturba la supervivencia embrionaria (Azawi, 2008).

4.1.3.4 Respuesta inflamatoria e inmune del útero postparto

El resultado de la contaminación uterina depende del número y grado de virulencia de los microorganismos presentes, la condición del útero y de sus inherentes mecanismos de defensa (Vanina & Luzbel de la Sota, 2012), como la involución del útero y cérvix, descarga del contenido uterino y movilización de las defensas naturales (moco, anticuerpos y células fagocíticas) (Azawi, 2008); disturbios en estos mecanismos permiten que microorganismos patógenos establezcan un proceso infeccioso en el útero (Dhaliwal *et al.*, 2001).

Tras la invasión de patógenos bacterianos como respuesta para prevenir el establecimiento de la infección uterina, genes de sustancias proinflamatorias (IL 1A, IL 1B, IL6, TNF y prostaglandina E sintetasa) (Bromfield *et al.*, 2015), incrementan el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos para combatir la infección y lograr la resolución de la enfermedad. Sin embargo, el incremento de estos mediadores, la afluencia de células inmunes y la inducción de factores antimicrobianos que trabajan en conjunto para eliminar la infección uterina tiene efectos negativos, ya que su persistencia conduce a la infertilidad en vacas que lograron la resolución de la infección (Strey *et al.*, 2014).

La inmunidad celular uterina es ejercida por PMNs, monocitos y macrófagos tisulares frente a bacterias patógenas y sus endotoxinas (Dhaliwal *et al.*, 2001), especialmente los PMNs son el principal mecanismo de defensa en el lumen del útero y un número elevado de estos refleja inflamación local (metritis o endometritis) (Barański *et al.*, 2012), la activación de estas células resulta en adherencia, fijación e ingestión de las bacterias invasoras y esta actividad fagocítica es reforzada por el sistema de complemento y por anticuerpos (Dhaliwal *et al.*, 2001).



4.2. Enfermedades uterinas

Las enfermedades uterinas en el ganado lechero son responsables de importantes pérdidas económicas debido a la disminución de la tasa de preñez, extensión de intervalos parto-concepción e incremento del porcentaje de descarte (Madoz, 2012). El desarrollo de enfermedad uterina depende de la respuesta inmune de la vaca, de la especie y número de bacterias patógenas que persisten en el lumen uterino, además depende del ambiente endócrino local del útero, en particular por acción de la progesterona (P_4), debido a que tiene un efecto inmunosupresor que lo hace susceptible a infecciones inespecíficas (Lewis, 2004).

Existen factores riesgo asociados al establecimiento de una infección uterina, entre ellos tenemos:

1. Lesión uterina

- Muerte fetal, partos gemelares, distocia y cesárea
- Retención de membranas fetales
- Retraso de la involución uterina

2. Condiciones metabólicas

- Fiebre de leche, cetosis y desplazamiento de abomaso

3. Balance entre patogenicidad e inmunidad

- Disminución de la función de los neutrófilos.
- Tipos de bacterias presentes en el lumen uterino
- Administración de progesterona o glucocorticoides y formación temprana de un cuerpo lúteo.
- Grado de higiene del medio ambiente del lugar de partos (Sheldon & Dobson, 2004).

4.2.1. Clasificación de las enfermedades uterinas

Las definiciones de las enfermedades uterinas varían entre los diferentes grupos de investigación, pero actualmente se ha llegado a un consenso para facilitar el estudio y



entendimiento de las mismas, clasificándolas de acuerdo a los días postparto en que se presente y a sus manifestaciones clínicas (Sheldon *et al.*, 2006).

1. **Metritis puerperal** ocurre en las dos primeras semanas después del parto (4 - 10 días) y se caracteriza por presentar signos sistémicos (fiebre).
2. **Metritis clínica** se la define a la infección uterina que se presenta hasta los 21 DPP sin manifestar alteraciones sistémicas, pero presentan descargas purulentas o mucopurulentas (Kaçar & Kaya, 2014).
3. **Endometritis clínica** (EC) se la define como la inflamación del endometrio después de 21 días posparto y puede presentar descarga vaginal purulenta o mucopurulenta.
4. **Endometritis subclínica** (ES) se la define como una inflamación crónica del endometrio a partir de los 21 a 47 DPP o en cualquier momento posterior a la recuperación histológica y en ausencia de signos clínicos (Plöntzke *et al.*, 2010), sospechando de ES únicamente cuando la eficiencia reproductiva de las vacas va disminuyendo (Gautam *et al.*, 2010).

4.2.1.1 Endometritis clínica

La EC se caracteriza por una inflamación superficial del endometrio avanzando hasta el estrato esponjoso, provocando cambios degenerativos en el epitelio superficial, congestión vascular, con edema del estroma y migración de granulocitos neutrófilos y otras células inflamatorias dentro del endometrio (Rutter, 2013). Se consideran vacas con EC a las que se detecta secreción mucopurulenta o purulenta (>50% de pus) en sus descargas vaginales (Giuliodori *et al.*, 2013) y su prevalencia se encuentra entre el 15–40% en hatos lecheros (Sheldon *et al.*, 2006).

4.2.1.2 Endometritis subclínica

La ES recientemente definida como una inflamación endometrial crónica que se presenta a partir de los 21 días (Dini *et al.*, 2015), y se caracteriza por un endometrio infiltrado extensivamente con granulocitos neutrófilo, que pueden ser reconocidos



solamente mediante un examen citológico del endometrio, puede presentar una mínima cantidad de exudado acumulado en el lumen del útero (Rutter, 2013).

Se ha planteado también que el incremento de PMNs en lumen uterino es debido a la presencia de bacterias o a sus endotoxinas (Kasimanickam et al., 2004). Sin embargo, al realizar cultivos bacteriológicos de vacas diagnosticadas con ES no arrojaron ningún aislamiento, lo que sugiere que la ES no está relacionada específicamente a una infección bacteriana (Madoz, 2012). Baranski *et al.*, 2012; afirman que la ES tienen mayor relación con la involución del útero y recuperación histológica del endometrio en el postparto y es la principal causa del síndrome de vaca repetidora.

Citológicamente la ES se define a la presencia de $\geq 18\%$ de células PMNs en muestras colectadas entre los 21 – 33 (DPP), o $\geq 10\%$ de PMNs en muestras obtenidas entre los 34 – 47 (DPP) y $\geq 5\%$ a los 40 a 60 DPP (Barlund *et al.*, 2008; Dubuc et al., 2010). Sin embargo, en un estudio realizado en Argentina en vacas en pastoreo se consideró un diagnóstico positivos valores $\geq 8\%$ de PMNs en muestras colectadas entre los 21 – 33 DPP, $\geq 6\%$ de PMNs en citologías obtenidas entre los 34 – 47 DPP y $\geq 4\%$ de PMNs para muestras recolectadas a los 48 – 62 DPP (Madoz, 2012)

El rendimiento reproductivo de las vacas con ES disminuye por el fallo de la implantación embrionaria, debido al efecto de las endotoxinas bacterianas y mediadores inflamatorios liberados por el huésped (citocinas y quimocinas) (Zobel *et al.*, 2014), de manera que baja la tasa de concepción, incrementa el número de servicios por concepción, extiende el intervalo parto – concepción y eleva la tasa de descarte por subfertilidad (Gautam *et al.*, 2010).

Entre los factores que predisponen a la endometritis subclínica en el periodo postparto, según García *et al.*, 2004:

- Retención de membranas fetales
- Parto
- Partos gemelares
- Temporada
- Baja condición corporal



- Hiperketonemia
- Incremento de la concentración sérica de haptoglobina en el periodo temprano del postparto.
- Incremento de niveles séricos de ácidos grasos no esterificados e hidroxibutirato (afectan la actividad normal de los neutrófilos) en el posparto temprano.

Otros factores asociados a endometritis subclínica son lisis temprana del cuerpo lúteo, por muerte embrionaria temprana, vacunación previo al parto (Smith, 2009), disminución del consumo de materia seca, hipocalcemia (Bülent *et al.*, 2015); también puede estar asociada con una recuperación de tejidos luego de una metritis clínica o un trauma (Sheldon *et al.*, 2009).

La prevalencia de ES en hatos lecheros es variable y va depender de las condiciones de manejo, los días postparto y el punto de corte del porcentaje de PMNs para su diagnóstico. Algunos autores determinan la prevalencia de ES utilizando el flushing y el cytobrush como método de diagnóstico y han encontrado un rango entre 12 y 53%, como se indica en la tabla 1.

Tabla 1 Resumen de estudios de prevalencia de endometritis subclínica en vacas Holstein.

Autores	DPP	Método diagnóstico	Prevalencia
Kasimanickam et al 2004	20 - 30	Cytobrush >18% neutrófilos	35%
Gilbert et al 2005	40 - 60	Cytobrush >5% neutrófilos	53%
Barlund et al 2008	28 - 41	Cytobrush >8% neutrófilos	12%
Galvao et al 2009	48 – 54	Flush \geq 5% neutrófilos	29%
Galvao et al 2009	32 – 38	Flush \geq 7% neutrófilos	38%
Dubuc et al 2010	32 – 38	Cytobrush \geq 6% neutrófilos	20%
Plontzke et al 2010	21 - 38	Cytobrush \geq 5% neutrófilos	38%

DPP= Días postparto.

Fuente. LeBlanc *et al.*, (2011). *Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows* (1610-1618). Canada.



4.2.1.2.1 Técnicas de diagnóstico para Endometritis Subclínica

El diagnóstico de ES puede ser realizado a través de biopsia uterina, ultrasonografía, citología endometrial (Barański *et al.*, 2012), palpación uterina transrectal, vaginoscopía y cultivos bacteriológicos de fluidos uterinos (Kasimanickam *et al.*, 2004). Sin embargo, cada uno de los métodos diagnósticos varía en cuanto a sensibilidad, especificidad, invasión de tejidos, costos, tiempo y facilidad de ejecución.

De los métodos anteriores la citología endometrial es utilizada con mayor frecuencia por su alta fiabilidad, simplicidad y bajo costo (Bogado *et al.*, 2016); este procedimiento se recomienda realizarlo luego de los 26 días postparto para evitar confusiones con los procesos regenerativos del endometrio durante el proceso de involución uterina (Dini *et al.*, 2015)

4.2.1.2.1.1 Citología endometrial

La examinación citológica del tracto reproductivo ha sido utilizada para evaluar posibles lesiones en los animales domésticos donde células inflamatorias y endometriales pueden ser colectadas mediante biopsias uterinas, lavado uterino, hisopados y cytobrush; todas las técnicas anteriores son idóneas para evaluar la citología endometrial sin embargo, varían en sensibilidad, especificidad, repetibilidad y grado de invasión al tejido endometrial (Barlund *et al.*, 2008). La citología endometrial tiene alta sensibilidad (95%) para el diagnóstico de ES entre los cuales incluyen el lavado uterino, hisopos y cytobrush, siendo estos métodos los menos invasivos sobre el tejido endometrial (Barlund *et al.*, 2008).

- **Biopsia uterina:** La biopsia uterina posiblemente constituye el método definitivo para el diagnóstico de ES, pero ocasiona mayor invasión del tejido endometrial y afecta el desempeño reproductivo de vacas lecheras (Thomé *et al.*, 2016). Además que requiere de destreza, excesivo tiempo y su elevado costo hacen de esta técnica útil solo en casos de investigación (Purohit *et al.*, 2015).

- **Lavado uterino:** La técnica de lavado uterino colecta células de una superficie más amplia del útero y proporciona una muestra más representativa del lumen uterino que un hisopado o una biopsia uterina, sin embargo esta técnica produce distorsión celular, irritación de la mucosa endometrial y requiere de más tiempo para su ejecución (Kasimanickam *et al.*, 2005).
- **Cytobrush:** Es el procedimiento más adecuado para el diagnóstico de ES (Barlund *et al.*, 2008); siendo menos invasiva que otros métodos (Kasimanickam *et al.*, 2005), garantiza una alta confiabilidad y no produce distorsión de las células endometriales, es una técnica de fácil ejecución, utiliza material descartable y no requiere de un equipo complejo ni costoso (Madoz, 2012). El procedimiento según Kasimanickam *et al.*, 2005 está explicado en detalle en el capítulo de metodología.



Figura 1 Procesamiento de muestra endometrial obtenida mediante la técnica de cytobrush

Fuente. Kasimanickam *et al.*, (2005). *A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows* (p 255-259). Canadá.

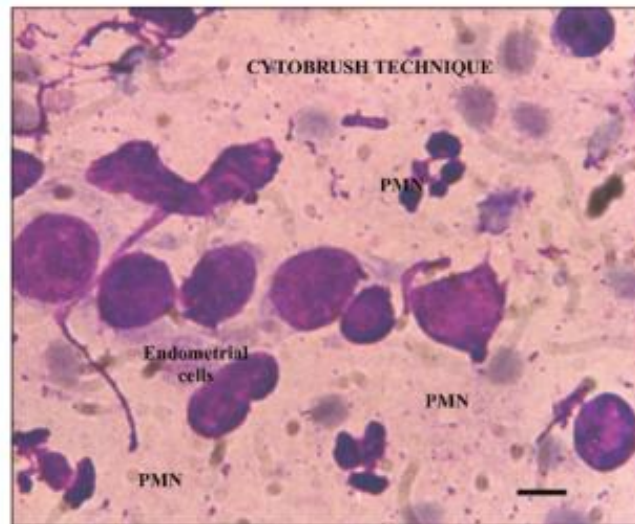
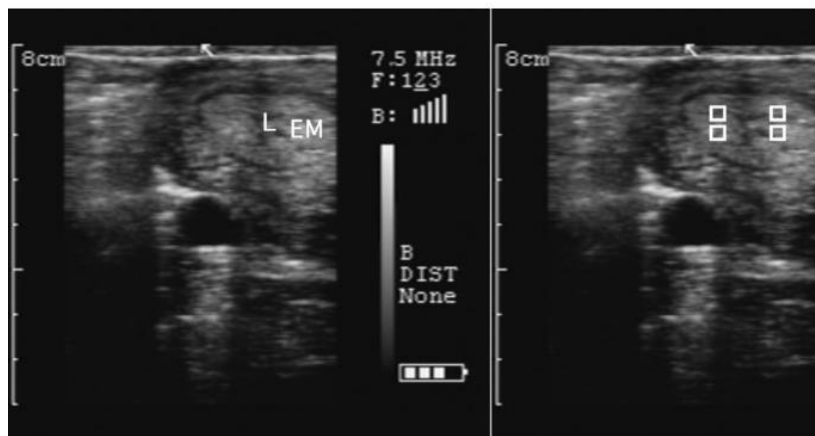


Figura 2 Vista microscópica a 400X de muestra endometrial teñida con Giemsa modificada: Polimorfonucleares y células endometriales

Fuente. Kasimanickam et al., (2005). *A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows* (p 255-259). Canadá.

4.2.1.2.1.2 Ultrasonografía

En el diagnóstico de ES los cambios ultrasonográficos detectables son el incremento de la cantidad de fluido en el lumen uterino, incremento en el diámetro cervical y de los cuernos uterinos, cambios en la ecotextura, aspectos que están asociados a crecimiento bacteriano e interrupción de la involución uterina. Sin embargo este método es menos sensible que la citología endometrial (Polat *et al.*, 2015).



L= Lumen uterino, EM= Mucosa endometrial y los cuadros el área de interés

Figura 3 Ecografía de la sección circular del útero.

Fuente: Polat et al., (2015). *Endometrial echotexture variables in postpartum cows with subclinical endometritis* (p 50-55). Turquía.



4.2.1.2.1.3 Vaginoscopía

Un examen por vaginoscopía se utiliza para detectar descargas uterinas anormales, es un método más sensible y específico para la detección de la EC que la palpación transrectal, sin embargo, la vaginoscopía a veces falla en la identificación de todas las vacas que están en riesgo de presentar bajo rendimiento reproductivo (Kasimanickam *et al.*, 2004).

Al realizar el examen con un espéculo vaginal se observa una inflamación y edema de la orificio cervical externo (*anillo de Burdi*), mostrándose hiperémica, inflamada y prolapsada (Smith, 2009), sin embargo se afirma que puede o no estar presente el prolapso del anillo de Burdi en procesos inflamatorios de útero y cérvix (Alvear, 2014; Hartmann *et al.*, 2016).

4.3. Terapias farmacológicas y alternas para endometritis subclínica

Una gama de alternativas terapéuticas son utilizadas en las enfermedades uterinas postparto entre las que se incluyen terapia con antibióticos locales y sistémicos (penicilinas, diestreptomicina, tetraciclinas y cefapirina), siendo el último la mejor elección (Kasimanickam *et al.*, 2005).

Tratamientos hormonales (PGF2 α) y con antisépticos también son utilizados por seguridad ya que estos no dejan residuos en leche ni carne, además que se evita la resistencia bacteriana y se reduce el riesgo de inactivación por el material purulento como es el caso de los antibióticos (Bülent *et al.*, 2015).

En los últimos años el ozono se ha incluido en el tratamiento de patologías del aparato reproductivo en vacas lecheras, mejorando su eficiencia reproductiva, además que no hay acumulo de residuos en leche, carne u otro tejido, evita la resistencia bacteriana y no se ha documentado efectos adversos ni reacción anafiláctica tras su aplicación (Đuričić *et al.*, 2015). Sin embargo, hay que considerar que específicamente para endometritis subclínica aún no existe un tratamiento eficiente (Dini *et al.*, 2015).



4.3.1. Tratamiento alopático: Cefapirina benzatínica

La forma farmacéutica que se encuentra en el mercado es la suspensión oleosa para aplicación intrauterina

4.3.1.1 Grupo farmacológico

La cefapirina benzatínica pertenece al grupo de antibióticos Beta-lactámicos, es una cefalosporina de primera generación (Plumb, 2010), tiene un amplio espectro de actividad contra bacterias Gram (+) y Gram (-) (Thomson, 2003).

4.3.1.2 Farmacodinamia

La cefapirina ejerce su efecto bactericida inhibiendo la síntesis de mucopeptidos en la pared celular, desarrollando una pared o barrera defectuosa sin estabilidad osmótica (Plumb, 2010) que termina en la lisis de la bacteria, pero la acción de la Cefapirina benzatínica es solo efectiva en células en crecimiento activo (Thomson, 2003).

La cefapirina benzatínica es resistente a la acción de la beta-lactamasas o penicilinasas y es activa en un ambiente anaeróbico tal como se encuentra en un proceso infeccioso del útero (Ahmadi & Ghaisari, 2005).

4.3.1.3 Parámetros farmacocinéticos

Luego de la administración intrauterina su absorción es baja, reflejada en los bajos niveles plasmáticos de 0.13 µg/ml a 1 a 3 horas después de la aplicación de 500 mg Cefapirina benzatínica (European Medicines Agency, 2001). Pasado las 12 horas de aplicado el tratamiento con Cefapirina los niveles plasmáticos están por debajo de valores detectables (0.01 µg/ml). Sin embargo, altas concentraciones de Cefapirina benzatínica son detectables en el endometrio 10,4µg/g a las 8 horas pos tratamiento (Irish Medicine Board, 2012), las concentraciones en el endometrio van disminuyendo pero mantiene la concentración mínima inhibitoria (CMI) 0,81µg/g hasta las 24 horas después de su aplicación (Ahmadi & Ghaisari, 2005). Su periodo de retiro en leche es de 0 días y en carne de 48 horas.



En una investigación la infusión intrauterina de cefapirina benzatínica resultó en un 80% de curación clínica y un 60% de curación bacteriológica en dos semanas de tratamiento (Kasimanickam *et al.*, 2005). En otro ensayo, en el que vacas diagnosticadas con endometritis subclínica mediante citología del contenido uterino, fueron tratadas con Cefapirina benzatínica intrauterina las cuales mejoraron su performance reproductivo (Runciman *et al.*, 2008). Esto se observaba solo cuando la administración de 500mg de Cefapirina benzatínica se la realizaba después de los 26 días postparto (Peter *et al.*, 2008).

El resultado de la investigación (Tabla 2) mostró que el tratamiento con Cefapirina benzatínica es más eficaz que la terapia hormonal (control), en este grupo encontraron evidencia significativa ($P < 0.05$) en la disminución de células inflamatorias especialmente neutrófilos; luego de 14 días de haber aplicado el tratamiento (Ahmadi & Ghaisari, 2005).

Tabla 2 Comparación de cambios citológicos del tratamiento con PGF2 α y Cefapirina benzatínica entre los 50–60 DPP.

Tratamiento	N	Neutrófilos
Control PGF2 α (1)	6	44.67 \pm 20.11c
Control PGF2 α (2)	6	9.00 \pm 5.11d
Metri-Care (1)	10	36.20 \pm 12.29a
Metri-Care (2)	10	5.70 \pm 3.26b

Valores con diferente letra en la misma columna tienen diferencia significativa ($P < 0.05$). (1)=día de aplicación del tratamiento, (2)=14 días después del tratamiento.

Fuente. Ahmadi & Ghaisari (2005). *The Effect of Intrauterine Cephalixin on Treatment of Endometritis in Commercial Dairy Cattle* (p 35-45). Iran.

4.3.2. Ozonoterapia

4.3.2.1 Generalidades

En la naturaleza el ozono es continuamente producido en la estratosfera por acción de los rayos ultravioleta que fragmentan las moléculas de oxígeno atmosférico (O₂) en dos átomos de oxígeno altamente reactivos que por reacciones endotérmicos cada



uno de estos átomos se combinan con una molécula de oxígeno intacto formando el ozono triatómico (O_3) (Bocci *et al.*, 2009). Artificialmente se obtiene utilizando un generador de ozono médico en el que el oxígeno puro pasa a través de un gradiente de alta tensión (5 -13 milivoltios “mV”), desencadenándose la siguiente reacción: $3O_2 + 68,400cal \rightarrow 2O_3$; siempre resultando una mezcla de gases que comprende oxígeno no menos de 95% y no más del 5% de ozono (Bocci, 2006).

El O_3 es 1,6 veces más denso y 10 veces más soluble en agua que el oxígeno; aunque el O_3 no es una molécula radical, es el tercer oxidante más potente después de flúor y el persulfato. El O_3 es un gas inestable que no puede ser almacenado y debe ser utilizado rápidamente, debido a que posee una vida media muy corta aproximadamente de 40 min a 20 °C (Bocci, 2006).

El ozono como cualquier otro gas se disuelve en agua, ya sea del plasma o en los fluidos extracelulares, o en la fina capa de agua que cubre la piel y en particular las mucosas de la tracto respiratorio, reproductivo e intestinal (Bocci, 2005).

4.3.2.2 Uso de la ozonoterapia

En medicina veterinaria se ha venido utilizando por más de 30 años, como terapia alternativa para ciertos trastornos como mastitis, metritis, endometritis, retención de membranas fetales, vaginitis, urovagina, laminitis y desórdenes neuromusculares (Đuričić *et al.*, 2015), en la clínica de pequeñas especies de igual manera, la ozonoterapia es eficaz en el tratamiento de desórdenes inmunomediados, osteoarticulares degenerativos, dermatopatías, etc. (Zamora, 2015).

Las propiedades del O_3 lo convierten en una molécula altamente reactiva capaz de inactivar bacterias, virus, hongos, levaduras, protozoarios, estimula el metabolismo del oxígeno en los tejidos, activa el sistema inmune y exhibe una fuerte actividad antiinflamatoria y analgésica (Djuricic *et al.*, 2012). Además, que optimiza los mecanismos de regeneración tisular, aplicado por vía intrauterina estimula la granulación, epitelización y activa el metabolismo local del tejido endometrial (Đuričić *et al.*, 2015).



Actualmente, el ozono es considerado como un agente terapéutico y preventivo en varias condiciones obstétricas y ginecológicas en vacas lecheras, principalmente en enfermedades puerperales (Calderon *et al.*, 2016), al momento varias investigaciones hacen evidente la eficacia del O₃, logrando mejorar el performance reproductivo de vacas tratadas en diferentes estadios y circunstancias del periodo postparto (Đuričić *et al.*, 2015).

4.3.2.3 Mecanismo de acción

El ozono reacciona inmediatamente tan pronto como sea disuelto en agua biológica (solución salina fisiológica, plasma, linfa, orina, etc) donde tiene lugar la siguiente reacción: $O_3 + \text{biomoléculas} \rightarrow O_2 + O^*$

Donde el oxígeno atómico (O^{*}) resultante se comporta como un átomo muy reactivo, en orden de preferencia, el ozono reacciona con los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), antioxidantes como el ácido ascórbico y úrico, compuestos de tiol con grupos -SH, tales como cisteína, glutatión reducido (GSH) y la albúmina y dependiendo de la dosis de ozono con carbohidratos, enzimas, ADN y ARN; todos estos compuestos actúan como donantes de electrones y se someten a la oxidación (Bocci, 2006). La reacción principal es:



Al minuto de la reacción se obtiene una molécula de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (especies reactivas de oxígeno, ROS) (Bocci, 2006). El peróxido de hidrógeno, lipoperoxidos, ozónidos y aldehídos actúan como mensajeros y se difunden al interior de las células activando distintas rutas metabólicas en eritrocitos, leucocitos y plaquetas, dando lugar a numerosos efectos biológicos y terapéuticos del O₃ (Schwartz & Martínez, 2012).

El Ozono tiene un efecto inmunomodulador, específicamente en leucocitos. Los ROS se difunden al interior de la célula y activan al factor nuclear (NF-κB) responsable de modificaciones génicas para la producción de muchos tipos de proteínas incluyendo citosinas (Larinna *et al.*, 2015); que activan células inmunes entre ellos tenemos IFN

Y, TNF α , IL-2, 6, 8 y factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF) (Bocci, 1996).

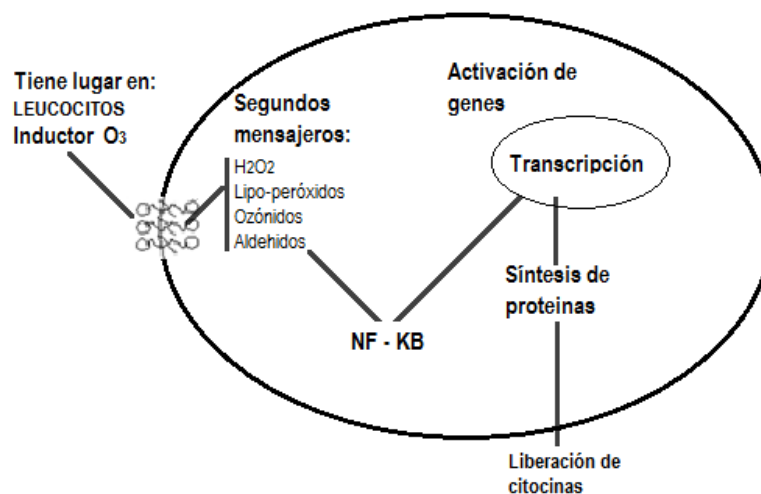


Figura 4 Mecanismo de acción del ozono como regulador de la síntesis de citosinas.

Fuente: Menéndez *et al.*, (2008). *El ozono: aspectos básicos y sus aplicaciones clínicas* (p 1-9) La Habana. Centro de Investigaciones del Ozono.

El ozono tiene amplio espectro de actividad bactericida, es capaz de eliminar bacterias Gram (+) y Gram (-) incluyendo *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*; ambas bacterias son tremendamente resistentes a los antibióticos. La capacidad germicida del O₃ se debe básicamente a su alta capacidad oxidante sobre la pared bacteriana (Bocci *et al.*, 2009), a través de la oxidación de fosfolípidos y lipoproteínas estructurales (Elvis & Ekta, 2011) alterando la función y permeabilidad selectiva de la membrana celular conduciendo a la lisis bacteriana (Cho *et al.*, 2014). Algunos estudios han demostrado que el O₃ desnaturaliza componentes intracelulares incluyendo la oxidación de proteínas, daño del ADN plasmídico y disminuye la actividad enzimática citosólica de la bacteria (Zhang *et al.*, 2011).

Es suficiente una exposición de 10 – 30 segundos con O₃ para eliminar un número significativo de bacterias, aproximadamente un 98% (Elvis & Ekta, 2011). Este hecho lo convierte en un germicida general de amplio espectro ante el cual no actúan los mecanismos clásicos de resistencia bacteriana (Đuričić *et al.*, 2015).

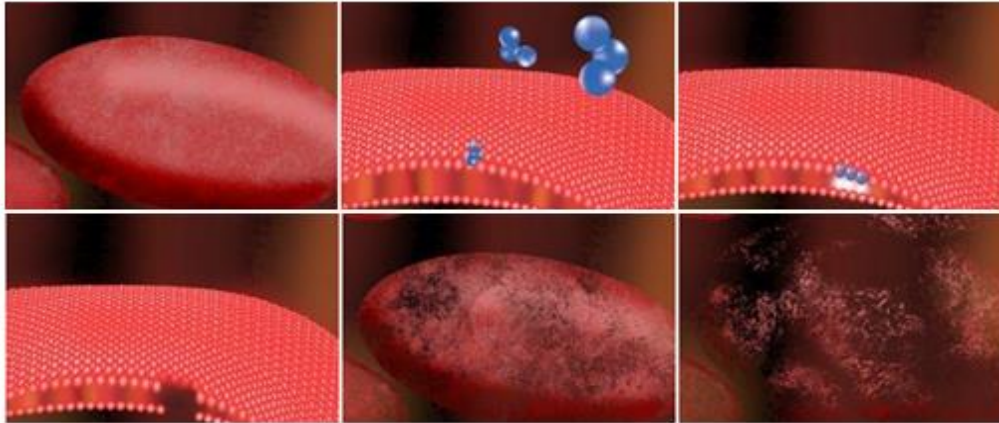


Figura 5 Representación del efecto bactericida del O_3 .

Fuente: Colorado Medical Waste, Inc (2010) *Effect of Ozone on Bacteria*. Oakland

El ozono tiene un mecanismo dual antiinflamatorio y analgésico, logra estos efectos actuando sobre diversos blancos: disminuyendo la producción de mediadores de la inflamación, la oxidación de algunos mediadores de la inflamación y mejorando la microcirculación sanguínea local, mejorando de esta manera la entrega de oxígeno a los tejidos, lo cual estimula la regeneración de estructuras anatómicas, eliminación de toxinas y resolución del disturbio que generó el dolor (Schwartz *et al.*, 2012).

El efecto antiinflamatorio del ozono se basa en su capacidad para oxidar compuestos que contienen enlaces dobles, entre ellos el ácido araquidónico y las prostaglandinas, estas últimas son sustancias biológicamente activas que se sintetizan a partir de dicho ácido y que participan en grandes concentraciones en el desarrollo y en el mantenimiento del proceso inflamatorio (Menéndez *et al.*, 2008). El mecanismo analgésico del ozono es activar mecanismos analgésicos endógenos que llevan a incrementar la concentración de endorfinas que tienen efecto analgésico. El tratamiento con ozono produce un efecto a corto y largo plazo (Schwartz *et al.*, 2012).

4.3.2.4 Concentración y dosificación

Debemos conocer la dosis óptima para lograr un efecto terapéutico sin ninguna toxicidad. Para lograr efectos positivos es importante conocer la concentración de O_3 ,



volumen del gas, tiempo de exposición como también el volumen o peso de los sustratos, particularmente de los componentes reductores (Bocci, 1996).

En medicina humana, se utilizan concentraciones de ozono-oxígeno entre 1 – 100 $\mu\text{g/ml}$ (Schwartz *et al.*, 2012). En medicina veterinaria, las concentraciones utilizadas van desde 6, 30, 50 y 70 $\mu\text{g/ml}$ (Freire, 2011), dependiendo de la vía, el vehículo y la forma de aplicación del O_3 (Đuričić *et al.*, 2015).

La dosis total de O_3 es equivalente al volumen del gas (ml) por la concentración del O_3 ($\mu\text{g/ml}$)

Por ejemplo:

$$\text{Volumen (100ml)} \times \text{Concentración (40}\mu\text{g)} = 4000\mu\text{g ó 4mg de Ozono}$$

Para trabajar con agua ozonificada es recomendable utilizar agua ultra pura, en este caso el O_3 se disuelve en el agua y su concentración es estable y equivalente al 25%, luego de 5 – 6 minutos de burbujeo. La solubilización del O_3 está de acuerdo a la ley de Henry (1803), donde indica que la concentración de saturación de un gas en agua es proporcional a su concentración (Bocci, 2006).

Es importante utilizar las concentraciones adecuadas, ya que bajas concentraciones no logran las propiedades terapéuticas del O_3 , o por otra parte altas concentraciones de O_3 significaría altos niveles de ROS (H_2O_2) que podrían superar los mecanismo antioxidantes y producir daño celular (Larinna *et al.*, 2015).

4.4. Impacto económico de la endometritis subclínica sobre la fertilidad en hatos lecheros

La rentabilidad en hatos lecheros se debe principalmente a la producción de leche y a la eficiencia reproductiva. En general, se busca preñar a una vaca tempranamente y se ha establecido un intervalo interparto entre 12 a 13 meses (Arbel *et al.*, 2001), y una ampliación sobre los días abiertos afecta de manera directa sobre intervalo interparto, aumentando los costos por día en 1 a 3 dólares por vaca en los Estados Unidos



(Cattaneo et al., 2015). Por otro lado, una de las principales causas de descarte de vacas es por infertilidad y los granjeros toman en cuenta varias razones para el descarte (partos, producción de leche, etapa de lactación, enfermedades) (Gröhn & Rajala-Schultz, 2000).

A nivel mundial existen algunas medidas o índices para evaluar la eficiencia reproductiva en hatos lecheros, entre estos tenemos intervalo entre partos (IIP), Intervalo parto celo (IPCe), intervalo parto concepción (IPCo), intervalo parto al primer servicio, tasa de concepción al primer servicio, número de servicios por vaca, días abiertos, etc. (Löf, 2012).

Los costos asociados con la ineficiencia reproductiva incluyen el incremento intervalo interparto, incremento del descarte y remplazo, incremento de los costos de labores asociados con la inseminación artificial e intervenciones veterinarias (Shalloo, Cromie, & McHugh, 2014), perdidas en la producción de leche debido a los días abiertos involuntarios y perdidas por ternero no nacido, estos costos están representados por dólares por vaca al día (Cattaneo et al., 2015).

4.4.1. Intervalo parto-celo (IPCe)

También se lo conoce como días de Lactación al primer celo observado que indica el momento del reinicio de la actividad ovárica y es una medida indirecta de la detección celo antes del servicio (González-Stagnaro, 2001). En la década de los setenta el IPCe se encontraba entre los 14 a 21 días después del parto y actualmente en vacas lecheras el promedio de IPCe es de 29 a 43 días; sin embargo el IPCe se está incrementando debido al balance energético negativo durante el periodo postparto temprano, lo cual reduce las ondas pulsátiles de LH y retrasa la reanudación de la actividad ovárica (Lucy, 2001). Para su cálculo se utiliza la siguiente fórmula:

$$IPCe = \frac{\text{Suma de los días desde el parto hasta el pimer celo observado en el periodo}}{\text{Número de vacas}}$$



4.4.2. Intervalo parto concepción al primer servicio (IPCo)

Se la denomina como días abiertos o vacíos de vacas gestantes y se utiliza para su cálculo animales en gestación (*González-Stagnaro, 2001*). Este indicador es fácil de calcular y entenderlo, sin embargo está influenciado por el manejo del hato, como por ejemplo el tiempo de espera voluntario, que se lo define como el tiempo transcurrido entre el parto y cuando le administrador decide que la vaca esta lista para ser servida (*Löf, 2012*). Los días abiertos promedio se encuentra entre los 85 - 100 días (*Brett & Meiring, 2015*), incluso puede extenderse hasta 125 días, sin embargo servicios postparto muy tempranos (≤ 90 días) disminuye el nivel de producción de leche (*González-Stagnaro, 2001*). El IPCo se puede calcular con la siguiente formula:

$$IPCo = \frac{\text{Suma total de los intervalos parto concepción de las vacas preñadas}}{\text{Número de vacas gestantes}}$$

4.4.3. Tasa de concepción al primer servicio

La tasa de concepción puede ser específico para un servicio y puede analizarse por separado e incluyen todas las vacas, incluso las vacas eliminadas posteriormente siempre y cuando se tenga el diagnóstico de preñez al momento de su eliminación o venta (*González-Stagnaro, 2001*). Los porcentajes de preñez al primer servicio deseado son de 50 - 60% en vacas productoras (*Brett & Meiring, 2015*), sin embargo el índice de concepción al primer servicio puede ser del 39% y se afirma que la tendencia genotípica y fenotípica sobre este índice es de 0,45% menos por año en Estados Unidos, mientras que en Reino Unido es del 1% (*Pryce & Veerkamp, 2001*). Para el cálculo del porcentaje de concepción al primer servicio se utiliza la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Concepción 1er servicio} = \frac{\text{Total de vacas al primer servicio que gestaron}}{\text{Número de vacas que fueron servidas}}$$



5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Materiales

Tabla 3 Materiales

Materiales		
Físicos	Químicos	Biológicos
Registros del hato	Gas ozono	Vacas Holstein
Hoja de campo	Cefapirina benzatínica 500 mg en suspensión	
Microscopio Olympus, Mod: CX31RBSFA	Solución destilada estéril (USP tipo II)	
Equipo Ozonificador (<i>Bioline BL-X2</i>)	Reactivo de Giemsa	
Citocepillo	Alcohol al 70%	
Catéter rígido y flexible	Agua destilada	
Camisas de protección	Yodo Povidine 5%	
Jeringas de 60 ml	Entellan	
Guantes quirúrgicos desechables	Xilol	
Guantes ginecológicos	Solución Buffer de Gurr	
Gel lubricante		
Papel absorbente		
Portaobjetos		
Cubreobjetos citoglass 24 x 50 mm		
Vasos coplin		
Vaginoscopio		
Linterna		
Ecógrafo Mindray Mod: DP-6600Vet		

5.2. Métodos

5.2.1. Selección de animales y diseño experimental

Para esta investigación las vacas fueron seleccionadas de la “*Granja Nero*” y la “*Granja Irquis*” de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, perteneciente a la Universidad de Cuenca y la Hacienda “*Cumbesa*”, desde febrero a noviembre de 2016 (Anexo 1). La “*Granja Nero*” está ubicada en la Provincia del Azuay a 12.5 km del cantón Cuenca a 3.100 msnm, con una temperatura promedio de 8 °C y una pluviosidad que varía de 500-1000 mm anuales. La “*Granja Irquis*” está ubicada en el km 23 de la vía Cuenca – Girón, en la parroquia Victoria del Portete, a 2663 msnm, tiene un clima templado



frío con una temperatura promedio de 8°C y una pluviosidad que varía de 770 y 1000mm anuales. La hacienda Cumbesa está ubicada en el Km 15 de la Vía Cuenca-Cumbe, a una altura de 2.640 msnm, perteneciente a la provincia Azuay, tiene un clima templado frío con una temperatura promedio de 8°C a 22°C y una pluviosidad que varía de 800 - 1500 mm anuales (Anexo 2).

Se incluyó vacas multiparas entre los 34 y 47 DPP, clínicamente sanas y que no hayan presentado enfermedades metabólicas, multíparas, con una condición corporal de 2,5 – 3, según la clasificación del NIRD (*National Institute of Research in Dairying*), alimentadas con una dieta basal de pasto y alimento balanceado. Las vacas en estudio fueron seleccionadas por medio de los registros reproductivos existentes en cada una de las granjas.

A estos animales se valoró el grado de inflamación y prolapso del anillo de Burdi mediante vaginoscopía, utilizando una escala 1 a 5, siendo uno totalmente protruido e inflamado y cinco sin inflamación ni protrusión (Anexo 3); luego se practicó una citología endometrial utilizando la “*técnica de cytobrush*” y se los dividió en tres grupos:

- G1 (n=30) se aplicó 500mg de CB en suspensión vía intrauterina.
- G2 (n=30) se aplicó 45 µg/ml de O₃ en 60 ml de agua destilada tipo II estéril por vía intrauterina.
- G3 (n=30) se consideró como el grupo testigo y fueron vacas que no presentaron ES.

5.2.2. Técnica de cytobrush y evaluación citológica

El diagnóstico de ES se lo realizó mediante citología endometrial utilizando la técnica de cytobrush descrita por Kasimanickam *et al.*, (2005). El método consiste en conectar el citocepillo a una pistola de transferencia de embriones, el cual se adapta a la bayoneta de la pistola y se lo protege con un catéter flexible de inseminación artificial, luego se coloca una camisa sanitaria para evitar la contaminación vaginal; luego se atraviesa por la cervix hacia la base del cuerno de mayor tamaño y se exterioriza el citocepillo. La muestra se toma girando el citocepillo en dirección de las manijas del



reloj, luego es reintroduce el cepillo para sacarlo del útero. Las placas para el examen citológico fueron preparadas haciendo rodar el citocepillo en el portaobjetos limpio, luego se fijó la muestra con citofijador (*Kasimanickam et al., 2005*) (Anexo 4). Las muestras fueron llevadas al laboratorio Clínico de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca para ser teñidas mediante Giemsa modificado, para su conservación se utilizó un medio de montaje con Entellan (Anexo 5). Posteriormente se remitieron las placas para un segundo análisis al Centro de Diagnóstico y Estudios Biomédicos de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Cuenca (Anexo 5).

Se preparó dos placas de citología endometrial y fueron evaluadas por dos ocasiones cada placa, contando cien células al azar utilizando el aumento de 10x y 40x (Olympus, Mod: CX31RBSFA) obteniendo el porcentaje de PMNs (Anexo 7). Los animales diagnosticados con ES fueron aplicados O₃ o CB al azar después de 24 horas de obtener el resultado (Anexo 8). Luego de 72 horas se realizó una segunda citología endometrial de la misma manera como se explicó anteriormente.

5.2.3. Análisis estadístico

Los datos fueron procesados en el software de análisis estadístico SAS 9.3 para Windows 10. Se utilizó un modelo lineal general mixto (PROC GLIMIX) para determinar la significancia de los tratamientos.

5.2.4. Análisis económico

Para determinar el impacto económico sobre el Intervalo parto celo, intervalo parto concepción y porcentaje de preñez de los tratamientos se utilizó los siguientes parámetros:



Tabla 4 Parámetros reproductivos para la determinación del impacto económico de los tratamientos

Símbolo	Parámetro	Unidad de medida
L/V _{305d}	Promedio de litros en 305 días de lactancia	Litros/día/vaca
\$/L	Precio promedio de litro de leche	Dólares/litro
\$/Th	Precio comercial de ternera	Dólares/ternera
\$/Tm	Precio comercial de ternero	Dólares/ternero
CIA	Costo promedio de servicio	Dólares/servicio
CVET	Costo por intervenciones veterinarias	Dólares/Servicios veterinarios
\$/hVaq	Costo por labor hora del vaquero	Dólares/hora/vaquero
CMED	Costos de medicamentos por tratamiento	Dólares/medicamento
TD	Tasa de descarte por infertilidad	Porcentaje
\$/VAC	Precio comercial de vaca de reemplazo	Dólares/vaca
\$/VDES	Precio comercial de vaca de descarte	Dólares/Vaca de descarte
DAI	Días abiertos involuntarios	Días

Para valorar el costo sobre el parámetro parto celo (IPCe) se consideró un periodo de espera voluntario de 60 días propuesto por Brett & Meiring, 2015. En los costos se incluyó los rubros de diagnóstico, tratamiento (CB y O₃) y labor de detección de celo.

En el análisis económico sobre el intervalo parto concepción al primer servicio (IPCo) se utilizó la metodología propuesta por Cattaneo *et al.*, 2015, los cuales consideran los costos por pérdida en producción de leche debido a la extensión involuntaria de los días de lactancia, perdida por ternero no nacido, intervenciones reproductivas (IA, exámenes ginecológicos, tratamientos médicos) y costo de reemplazo debido a infertilidad. La suma de estos ítems representa las pérdidas económicas por días abiertos involuntarios y son expresados en dólares/vaca/día.



Para estimar el impacto económico de los tratamientos sobre el porcentaje de concepción al primer servicio se utilizó la metodología de cálculo propuesta por De Vries *et al.*, 2010, en donde considera la diferencia entre los beneficios esperados en la próxima lactancia y los costos de preñez.



6. RESULTADOS

6.1. Efecto de los tratamientos sobre la endometritis subclínica

El total de animales que se incluyó en el estudio fueron 90, se dividió en tres grupos G1 CB (n= 30), G2 O₃ (n= 30) y G3 testigo (n= 30) con las siguientes características (tabla 5): el promedio de partos fue de $2,6 \pm 0,13$; $2,8 \pm 0,19$ y $2,6 \pm 0,18$ respectivamente (Anexo 9); las citologías endometriales obtenidas mediante la técnica de cytobrush se las realizó entre los $40,97 \pm 0,833$ para G1; $40,43 \pm 0,832$ para G2 y $40,6 \pm 0,76$ DPP para G3 (Anexo 10), en la evaluación del Anillo de Burdi se obtuvo un rango de $3,57 \pm 0,171$; $3,63 \pm 0,162$ y $3,7 \pm 0,16$ para G1, G2 y G3 respectivamente, (Anexo 11); la condición corporal promedio de las vacas fue de $2,7 \pm 0,04$ para los dos primeros grupos y $2,74 \pm 0,032$ para G3 (Anexo 12).

Tabla 5 Características generales del grupo de animales seleccionados

Tratamiento	Número de partos	Días postparto	Anillo de Burdi*	Condición corporal
G1 (n=30)	$2,6 \pm 0,13$	$40,9 \pm 0,83$	$3,6 \pm 0,17$	$2,7 \pm 0,04$
G2 (n=30)	$2,8 \pm 0,19$	$40,4 \pm 0,83$	$3,6 \pm 0,16$	$2,7 \pm 0,04$
G3 (n=30)	$2,6 \pm 0,18$	$40,6 \pm 0,76$	$3,7 \pm 0,16$	$2,7 \pm 0,03$

* Primer anillo de la cervix evaluada en escala 1 a 5, siendo 1 totalmente protruido e inflamado y 5 sin inflamación ni protrusión.

G1= Cefapirina benzatínica en suspensión, G2= Agua destilada tipo II ozonificada, G3= Grupo testigo

El porcentaje de PMNs encontrado entre los 34 a 47 DPP fue $16,2 \pm 0,09\%$ para G1; $15,1 \pm 0,09\%$ para G2, en el caso del grupo testigo conformado por vacas sanas el promedio fue de $3,4 \pm 0,19\%$ (Anexo 13), luego de 72 horas de haber sido aplicados los tratamientos se evaluó su efecto sobre el porcentaje de PMNs mostrando una diferencia significativa ($P < 0,0001$) entre G1= $6,2 \pm 0,04\%$ y G2= $3,2 \pm 0,05\%$, de igual manera, G1 frente a G3 ($2,9 \pm 0,15$) presentó diferencia significativa ($P < 0,0001$), por otro lado G2 no presenta diferencia estadística al compararlo con G3 ($P > 0,05$) (Anexo 14), es decir que el G2 alcanzo un porcentaje cercano de PMNs a las vacas sanas del G3 (Tabla 6).

Tabla 6 Efecto terapéutico de los tratamientos

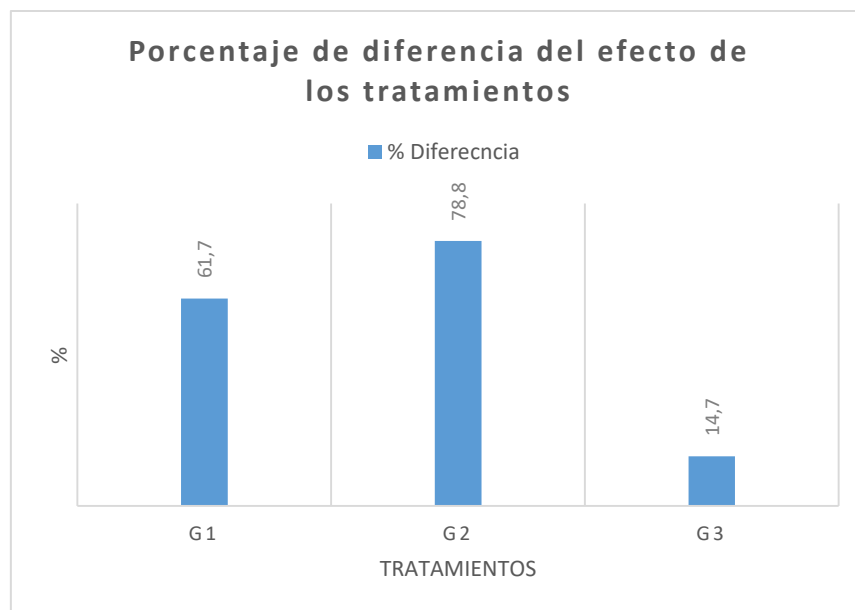
Tratamiento	PMNs 34-47 DPP (%)	PMNs 72 horas post-tratamiento (%)
G1	16,2 ± 0,09	6,2 ± 0,04 ^a
G2	15,1 ± 0,09	3,2 ± 0,05 ^b
G3	3,4 ± 0,19	2,9 ± 0,15 ^b

^{a,b} diferentes en la misma columna presentan diferencias significativas para un $P < 0,05$

PMNs= Células polimorfonucleares en muestras de citología endometrial

G1= Cefapirina benzatínica en suspensión, G2= Agua destilada tipo II ozonificada G3= Grupo testigo

Al comparar el efecto de tratamientos sobre el porcentaje de PMNs se observa una diferencia de 17,1% de eficacia para la solución ozonificada sobre la cefapirina benzatínica, mientras que la variación en el grupo testigo fue de 14,7% (Figura 6).


Figura 6 Diferencia del efecto de los tratamientos

En la tabla 7 se muestra el análisis de correlación entre PMNs y DPP (34 y 47) en donde se determinó una relación inversa de 0,224 ($P < 0,05$) (Anexo 15). En cambio, la correlación entre PMNs y CC no fue significativa ($P > 0,05$) obteniéndose valores bajos (0,143) (Anexo 15). Por otra parte, la relación entre PMNs y Anillo de Burdi se encontró una asociación inversa baja ($r_{xy} = 0,042$), pero no fue significativo ($P > 0,05$) (Anexo 17).

**Tabla 7** Correlación del porcentaje de polimorfonucleares

Variables	N°	r_{xy}	P
PMNs - DPP	90	- 0,224	0,006
PMNs - CC	90	0,143	0,276
PMNs - AB	90	-0,042	0,690

PMNs= Células polimorfonucleares en muestras de citología endometrial
DPP= días postparto; CC= Condición corporal; AB= Anillo de Burdi

6.2. Efecto de los tratamientos sobre el intervalo parto celo, intervalo parto concepción y porcentaje de preñez

Al analizar el efecto de los tratamientos sobre el intervalo parto celo (IPCe) en G1 fue $94,2 \pm 0,06$; G2 $89,1 \pm 0,07$ y G3 $84,7 \pm 0,07$ días, sin mostrar diferencia estadística ($P>0.05$) entre los tratamientos (Anexo 18). En el parámetro intervalo parto concepción (IPCo) al primer servicio se obtuvo $105,2 \pm 0,06$; $96,3 \pm 0,05$ y $99,5 \pm 0,07$ días para G1, G2 y G3 respectivamente, en donde los tratamientos no muestran diferencia estadística ($P>0.05$) (Anexo 19). Por otro lado, el porcentaje de preñez al primer servicio en G2 fue numéricamente superior ($63,3 \pm 0,20$) a G1 ($43,3 \pm 0,17$) y a G3 ($36,7 \pm 0,22$), sin embargo, los tratamientos no presentaron diferencia estadística ($P>0.05$) (Anexo 20), como se muestran en la tabla 8.

Tabla 8: Efecto de los tratamientos sobre el performance reproductivo

Grupos	N° de vacas preñadas	IPCe (días)	IPCo (días)	% PR
G1 (n=30)	13	$94,2 \pm 0,06^a$	$105,2 \pm 0,06^a$	$43,3 \pm 0,20^a$
G2 (n=30)	19	$89,1 \pm 0,07^a$	$96,3 \pm 0,05^a$	$63,3 \pm 0,17^a$
G3 (n=30)	11	$84,7 \pm 0,07^a$	$99,5 \pm 0,07^a$	$36,7 \pm 0,22^a$

^{a,b,c} diferentes en la misma columna presenta diferencias significativas para un $P<0,05$

G1= Cefapirina benztatínica en suspensión, G2= Agua destilada tipo II ozonificada; G3= Grupo testigo
IPCe= Intervalo parto celo; IPCo= Intervalo parto concepción; %PR= Porcentaje de preñez



6.3. Impacto económico de los tratamientos sobre el intervalo parto celo, intervalo parto concepción y porcentaje de preñez

6.3.1. Costo de los tratamientos

El costo total para el tratamiento con cefapirina benzatínica fue de \$717,36 y el costo unitario \$23,91 (Tabla 9), del cual el 56,87% (\$13,60) representa el antibiótico, en cambio el diagnóstico de ES fue el segundo rubro más representativo con un 30,68% (\$7,34) y el 12,44% representan la mano de obra, servicios básicos, depreciación de equipos y otros (\$2,97) (Figura 7). En cambio, el tratamiento con agua destilada tipo II ozonificada tiene un costo total de \$442,98 y el costo por vaca \$14,77 (Tabla 9), del cual el 14,11% (\$2,08) del costo total representa el ozono (Figura 8). La diferencia entre el costo total de G1 con respecto al de G2 es de 38,26% (\$9,14).

Tabla 9 Estructura de costos de los tratamientos

Estructura de costos de los tratamientos				
	Cefapirina benzatínica		Solución ozonificada	
Insumo	Costo	Unitario	Costo	Unitario
1. Laboratorio	220,08	7,34	220,08	7,34
2. Mano de obra	48,60	1,62	48,60	1,62
3. Equipos	6,63	0,22	27,04	0,90
4. Servicios básicos	0,06	0,00	2,06	0,07
5. Fármacos	408,00	13,60	62,50	2,08
6. Otros	34,00	1,13	82,70	2,76
TOTAL	717,36	23,91	442,98	14,77

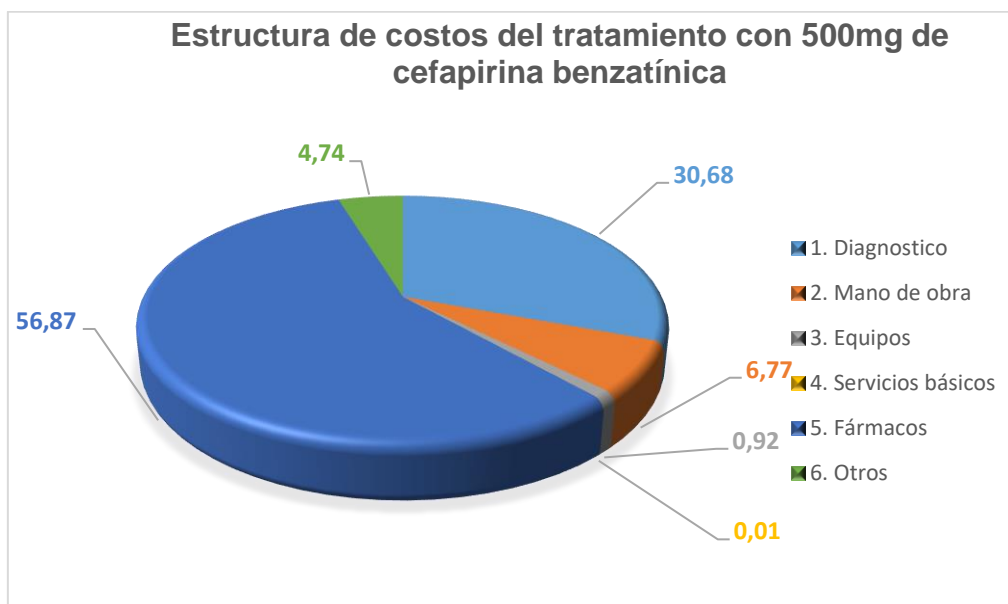


Figura 7 Estructura de costos de la Cefapirina benzatínica



Figura 8 Estructura de costos del tratamiento con agua destilada tipo II ozonificada

En el caso de G3 el costo total del diagnóstico de Endometritis Subclínica fue \$220,08 y el costo unitario \$7,34 (Tabla 10), donde el costo más representativo fueron los materiales de laboratorio 51,25%, seguido por los costos de mano de obra 22,08% (\$1,62). Los rubros de depreciación de equipos, servicios básicos, desinfectantes y materiales de campo suman 26,67% (\$1,35) (Figura 9).

Tabla 10 Estructura de costos del grupo testigo

Estructura de costos del grupo testigo		
Insumo	Costo	Unitario
1. Materiales de laboratorio	112,79	3,76
2. Mano de obra	48,60	1,62
3. Equipos	6,63	0,22
4. Servicios básicos	0,06	0,00
5. Desinfectantes	18,00	0,60
6. Materiales de campo	34,00	1,13
TOTAL	220,08	7,34

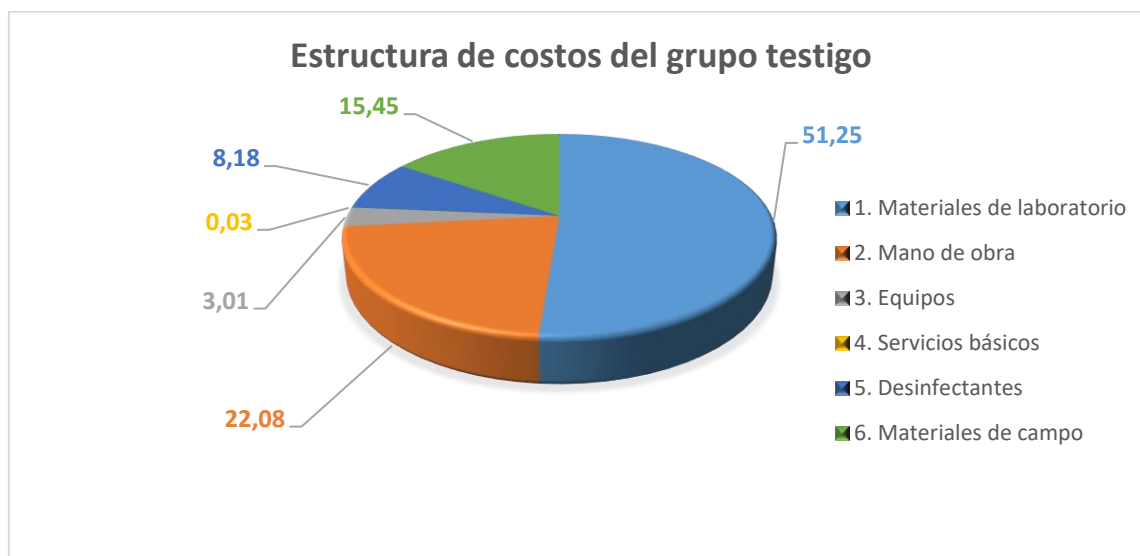


Figura 9 Estructura de costos del grupo testigo

6.3.2. Impacto económico de los tratamientos sobre el intervalo parto celo

Para determinar el impacto económico sobre el intervalo parto celo se consideraron el costo del diagnóstico y tratamiento de ES más el costo por detección de celos, considerando un periodo de espera voluntario de 60 días, a partir de este tiempo se obtuvo un costo por día de celo no observado de \$2,12 (Tabla 11). El IPCe en G1 fueron 94,2 días y se obtuvo un costo total de \$72,40; en cambio en G2 fue menor (89,1 días), por lo tanto el costo total se redujo a \$61,61 en comparación con G1. Al comparar el costo total de G2 frente a G3 hubo una diferencia de \$9,32.

**Tabla 11** Impacto económico sobre el intervalo parto celo

Análisis económico del Intervalo parto Celo				
	Costo/día	G1	G2	G3
IPCe (días)		94,2	89,1	84,7
Diagnóstico y tratamiento	0,80	27,26	23,19	19,69
Labor de detección de celo	1,32	45,14	38,41	32,60
Total costos/día/vaca	2,12	72,40	61,61	52,29

IPCe = Intervalo parto celo

G1= Cefapirina benzatínica en suspensión, G2= Agua destilada tipo II ozonificada; G3= Grupo testigo

Para estimar el impacto económico de los tratamientos sobre el intervalo parto concepción se consideró 90 días como el tiempo aceptable para preñar una vaca, por lo tanto se calculó los costos por las pérdidas en leche, perdida por ternero no nacido, intervenciones reproductivas y perdidas por descarte debido a infertilidad, estableciendo el costo por día abierto de \$5,79 (Tabla 12), en donde las perdidas por lactancia por vaca en G1 y G2 fue de \$100,15 y \$39,59 respectivamente, por otro lado, en grupo testigo alcanzó un costo total por vaca de \$82,81.

Tabla 12 Impacto económico sobre el intervalo parto concepción

Análisis económico del Intervalo parto concepción				
	Pérdida/día	G1	G2	G3
IPCo		105,20	96,30	99,50
Pérdidas en leche	2,22	33,68	13,96	21,05
Pérdidas por ternero no nacido	0,96	14,62	6,06	21,05
Intervenciones reproductivas	0,54	20,38	6,53	21,05
Descarte por infertilidad	2,07	31,48	13,05	19,67
COSTO TOTAL	5,79	100,15	39,59	82,81

IPCo= Intervalo parto concepción

G1= Cefapirina benzatínica en suspensión, G2= Agua destilada tipo II ozonificada; G3= Grupo testigo

Las formulas y datos considerados para el cálculo de estos costos se encuentran en el anexo 24

Para evaluar el impacto económico de los tratamientos sobre el porcentaje de preñez se estimó el valor de la preñez que equivale a la suma de diferencias entre los ingresos por venta de leche, venta de ternera menos los costos de remplazo, alimentación, inseminación artificial y costos por tratamientos reproductivos, obteniéndose los siguientes resultados: para G1 y G2 los ingresos esperados por vaca preñada fue de \$686,54 y \$695,69, respectivamente (Tabla 13), y al proyectar por el total de vacas



que gestaron en cada grupo se espera un ingreso total de \$8829,70 para G1 (13) y \$13218,10 para G2 (19). En cambio, en G3 (11) el ingreso esperado es \$703,12 con un ingreso total de \$7734,32, siendo este valor menor a los dos tratamientos antes mencionados.

Tabla 13 Impacto económico sobre el intervalo parto concepción

Análisis económico sobre el porcentaje de preñez			
	G1	G2	G3
Porcentaje de preñez	43,30	63,30	36,70
Número de lactancia promedio	2,43	2,36	2,36
Ingresos/venta de leche	2044,80	2044,80	2044,80
Ingresos/venta de terneros	360,67	360,67	360,67
² Costo de reemplazo	1553,09	1553,09	1553,09
Costo de alimentación	114,77	114,77	114,77
Costo por IA	27,15	27,15	27,15
Costo/tratamiento reproductivo	23,91	14,77	7,34
¹ Ingresos esperados por preñez	686,54	695,69	703,12
Número de vacas preñadas	13	19	11
Total ingresos	8925,06	13218,10	7734,32

G1= Cefapirina benztínica en suspensión, G2= Agua destilada tipo II ozonificada; G3= Grupo testigo
IA= Inseminación Artificial

¹Ingresos esperados por preñez= (Ingreso de la venta de leche + Ingreso de venta de terneros) – (Costo de reemplazo +Costo de la alimentación + Costo por IA + Costo tratamiento reproductivo)

²Costo de reemplazo = Costo de la vaca de reemplazo – Costo vaca descarte



7. DISCUSIÓN

7.1. Efecto de los tratamientos sobre la endometritis subclínica

Los PMNs y CC no presentaron correlación ($P=0,276$), esto nos indica que la CC no afecta a los resultados obtenidos en esta investigación, debido a que una CC $<2,5$ puede ser un factor predisponente de ES en vacas en periodo postparto, como lo demuestra Carneiro et al. 2014, en donde vacas con baja CC ($<2,5$) tienen mayor incidencia de ES, además Kasimanickam et al. 2013, evalúan vacas lecheras con inflamación del útero entre 1-35 DDP, y observan que el 66.7% de estos animales persiste con una inflamación del útero dos semanas después de la primera evaluación, perdiendo en este periodo 0,5 puntos de CC, mientras el resto conservó la CC y se recuperó naturalmente 1 a 5 semanas después del parto.

En la variables de los DPP presentó una correlación inversa con un valor $r_{xy}=0,224$, siendo esta relación significativa ($P=0,006$), lo que se interpreta que a medida que pasan los días postparto disminuye el porcentaje de PMNs en el endometrio, como lo afirma Kasimanickam et al. 2013, que a medida que avanza la recuperación histológica en los días postparto el porcentaje de PMNs va disminuyendo.

El anillo de Burdi y los PMNs presentaron una relación inversa baja ($r_{xy}=0,042$) ($P>0,05$), es decir que conforme aumentan los DPP el prolapso e inflamación del anillo de Burdi disminuye, como lo demuestra Hartmann et al. 2016, al relacionar la inflamación de la cervix con la inflamación uterina en vacas lecheras en el periodo postparto, y encuentran que el 66,3% de las vacas presentan cervicitis, pero no presentan ES ($P>0,05$), de igual manera Deguillaume et al. 2012 no encuentra asociación entre la inflamación del endometrio ($\%PMN \geq 5$) frente a la cervicitis ($\%PMN \geq 6$) entre los 21 a 60 DPP y concluyen que la presencia (ausencia) de cervicitis no fue indicativa de la presencia (ausencia) de endometritis subclínica.

El porcentaje promedio de PMNs en esta investigación fue de 16,17% para G1 y 15,13% para G2, valores cercanos obtiene Dini et al. 2015, en muestras recolectadas a los 30 DPP obtuvo 10% y 20% para el grupo control y el grupo tratamiento, en cambio



Dubuc et al. 2010 a los 38 DPP determinan 19% de PMN en un estudio realizado en Canadá en vacas Holstein. En cambio, el G3 presentó un 3,4% de PMNs, considerado como valores normales en el periodo postparto de estudio, como lo sugiere Madoz, 2012 que vacas normales en el porcentaje de PMNs no deben superar el 5%, ya que a partir de este umbral disminuye la eficiencia reproductiva. Todos estos valores sugieren que la citología endometrial que se utiliza para el diagnóstico de ES tiene alta repetibilidad y especificidad.

El efecto de los tratamientos sobre los polimorfonucleares fue mayor en el ozono ($3,2 \pm 0,05$) frente a la CB ($6,2 \pm 0,04$), por lo tanto los dos tratamientos disminuyen PMNs, como lo demuestra Ahmadi & Ghaisari, 2005, en donde aplicaron 500 mg CB entre los 50 – 60 DPP y obtuvieron una reducción significativa ($P < 0,05$) de PMNs de 36,20% a 5,70% 14 días después de haber aplicado el tratamiento, de igual manera Trentin et al. 2015, utilizaron 500 mg de ceftiofur en infusión vía intrauterina obteniendo una reducción en PMNs de $8.5 \pm 0.6\%$ a $0.5 \pm 0.2\%$ post tratamiento ($P = 0.002$).

Por otro lado, al ser una investigación nueva que evalúa el efecto del ozono sobre el porcentaje de PMNs, no existe información suficiente para contrastar los resultados obtenidos, sin embargo las investigaciones realizadas sobre ozonoterapia están dirigidas a evaluar el impacto del O_3 sobre el performance reproductivo, como se analizará más adelante.

7.2. Efecto de los tratamientos sobre el intervalo parto celo, intervalo parto concepción y porcentaje de preñez

El IPCe fue 94,2; 89,9 y 84,7 días para el tratamiento con CB, O_3 y grupo testigo respectivamente, el IPCo al primer servicio de la CB, O_3 y grupo testigo fue 105,2; 96,3 y 99,4 días, mientras que el porcentaje de preñez fue para CB 43,3; O_3 63,3 y 36,7% para el grupo testigo.

Kasimanickam et al. 2004, evalúan el efecto de la infusión de 500 mg CB aplicados vía intrauterina sobre el performance reproductivo de vacas Holstein entre los 21 – 30



DPP; obteniendo un promedio IPCe de 84, IPCo de 106 días y el porcentaje de preñez al primer servicio del 42% ($P < 0,05$), presentando una diferencia mayor de 10,2 y 22 días en el IPCe e IPCo respectivamente, mientras que el porcentaje de preñez presenta una diferencia de 1,3% a los obtenidos en esta investigación, sin embargo Robichaud & Dubuc, 2015 obtiene un porcentaje de preñez de 33,9% al administrar 500mg de CB vía IU en vacas diagnosticadas con ES entre los 35 ± 7 DPP ($P < 0,01$), porcentaje inferior al obtenido en este estudio.

Por otro lado, Constatin & Birtoiu, 2016 aplicaron O_3 por vía intrauterina en vacas Holstein determinando un promedio IPCe de 65,4 días, IPCo de 112,3 días y una tasa de concepción al primer servicio de 50%, valores inferiores a los obtenidos en esta investigación, a excepción del IPCo (96,3 días) fue mayor con una diferencia aproximada 16 días. En cambio, Polat et al., 2015 evalúan el efecto de la ozonoterapia (< 90 DPP) sobre el IPCo, en donde alcanza 129.4 ± 9.0 y 125.0 ± 13.1 días para el tratamiento con ozono y rifaximina respectivamente ($P > 0,05$), Duricic et al., 2014 investigan la eficacia del ozono en vacas Holstein diagnosticadas con ES entre los 25 – 45 DPP determinando IPCe de 106,86 días y un IPCo al primer servicio de 133,5 días; en ambos casos los valores son mayores a los valores encontrados en esta investigación (89,1 y 96,3 días, respectivamente).

7.3. Impacto económico de los tratamientos sobre el intervalo parto celo, intervalo parto concepción y porcentaje de preñez

Para determinar el impacto económico de los tratamientos sobre los parámetros reproductivos se calculó el costo unitario de los tratamientos, involucrando los costos de laboratorio, fármacos, costos de mano de obra, servicios básicos, depreciación de equipos y otros; además se consideró, los costos de detección de celo, las perdidas por día abierto, en donde incluyen perdidas por leche debido a extensión de la lactancia, perdidas por ternero no nacido, costos adicionales por intervenciones reproductivas y costos por remplazo de vacas infértiles.



Es importante evaluar el performance reproductivo en términos económicos para estimar la rentabilidad futura de cada vaca, como lo menciona Gröhn & Rajala, 2000 que la ineficiencia en el performance reproductivo afecta los ingresos netos de hatos lecheros, debido a que se reduce la producción de leche, el número de terneros nacidos, incrementa los costos por servicios veterinarios y aumenta la tasa de descarte por infertilidad.

Por lo tanto, en esta investigación se avaluó la influencia de los tratamientos sobre el IPCe, IPCo y porcentaje de preñez al primer servicio, sin embargo no presentaron diferencia estadística, pero en términos financieros existe una diferencia considerable en el costo unitario de los tratamientos, siendo \$14,77 para la solución ozonificada y \$23,92 en el caso de la cefapirina, exhibiendo una diferencia de \$9,15 por vaca tratada.

En el caso del IPCe se estableció un costo por día de celo no detectado, a partir de los 60 DPP, de \$2,12/vaca/día (incluyen costos de labor detección de celo más costo por tratamiento), en donde el tratamiento con CB tiene un costo total de \$72,40 frente al agua destilada ozonificada de \$61,61. Esta variación se da por la diferencia de días entre G1 y G2 (94,2 y 89,1 respectivamente); por lo tanto, el intervalo parto celo en G2 se reduce 5,1 días aproximadamente en relación a G1, lo que minimiza las pérdidas económicas, como lo afirma Bilby, 2009 que el fallo en la detección eficiente del celo acarrea problemas en los programas reproductivos, lo que representa importantes pérdidas económicas para los ganaderos.

Para el cálculo de los costos por día abierto se tomó 90 días como el tiempo óptimo para preñar una vaca, en donde se estimó un costo de \$5,79/vaca/día a partir de este periodo (Anexo 24), que al multiplicar por el total de días abiertos en cada tratamiento se obtuvo un valor mayor para G1 con \$100,15 y en el caso de G2 de \$39,59 presentándose una diferencia de \$60,56; esto se debe a la diferencia de días abiertos entre los tratamientos (105,20 y 96,30 respectivamente). Los costos por día abierto que obtiene LeBlanc, 2007 fue de \$4,70 valores cercanos al de esta investigación, sin embargo estos montos pueden variar como lo afirma De Vries *et al.* 2010 en donde



obtiene un valor por día abierto entre \$ 0.81 a \$ 13.33 y puede aumentar conforme las condiciones económicas empeoran, como por ejemplo menor persistencia y ausencia de oportunidades de reproducción después de 213 días.

Sin embargo, Arbel *et al.* 2001 afirma que la rentabilidad de los hatos lecheros van a depender de la producción de leche y el performance reproductivo, resultando optimo alcanzar un intervalo entre partos de 12 a 13 meses, pero al mismo tiempo en vacas de alta producción y persistencia sería ventajoso alargar el número de días abiertos (IPCo de 90, 110, 130), debido a que los beneficios vaca/leche/año van a ser superiores asociados a una prolongación de la lactancia.

Para establecer el valor de la preñez se consideró los ingresos por venta de leche y terneros menos los costos de alimentación, tratamiento reproductivo, IA y costo de remplazo. En G1 se obtuvo una tasa de preñez de 43,3% con un ingreso esperado de \$686,54/vaca/lactancia, en cambio para G2 la tasa de preñez fue de 63,3% con un ingreso estimado de \$695,69/vaca/lactancia, marcando una diferencia de \$9,15, pero al multiplicar por el número de vacas preñadas en cada uno de los tratamientos (G1 = 13, G 2= 19) se obtiene un total de ingresos esperados de \$8.925,06 para G1 y \$13.218,10 para G2.

De igual manera LeBlanc, 2007 estableció el valor de preñez entre \$300 a \$600, esta variación depende del número de lactancias, nivel de producción, días en lactancia y estado de preñez, sin embargo estimar el valor de la preñez se convierte en una tarea difícil, pero puede ser útil para proyectar cual será el retorno económico por vaca en la próxima lactancia a nivel de campo.

Los parámetros reproductivos que se evaluaron en esta investigación están por los valores recomendados en muchos países, como Estados Unidos, Canadá, Gran Bretaña, entre otros, sin embargo los ingresos y egresos de las granjas lecheras dependerán en cada uno de estos países, en donde están influenciados por los costos de producción, impuestos, precios en el mercado de insumos, alimento, etc.



8. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

El tratamiento alopático y la solución de agua destilada ozonificada reducen el porcentaje de polimorfonucleares en vacas con endometritis subclínica en el periodo postparto a las 72 horas post tratamiento, sin embargo el tratamiento con solución de agua destilada ozonificada a una dosis de 2,7mg en 60 ml es más eficaz que la cefapirina benzatínica en la disminución de polimorfonucleares, logrando un mejor efecto sobre la salud uterina en el periodo postparto.

La inflamación y protrusión del anillo de Burdi ocurren de manera independiente a los procesos inflamatorios subclínicos del endometrio (ES).

La presencia de polimorfonucleares esta inversamente asociado a los días postparto, es decir mayor los DPP menor el porcentaje de PMNs.

Al evaluar el performance reproductivo entre los tratamientos no presentaron diferencia estadística, donde no se logra mejorar el intervalo parto celo, en cambio el intervalo parto concepción se mantiene dentro de los parámetros normales; por otro lado el agua destilada ozonificada tiene un mayor porcentaje de preñez al primer servicio comparado con el tratamiento alopático, por lo tanto mejora la fertilidad en el periodo postparto.

El impacto económico del tratamiento con solución destilada ozonificada es positivo en comparación con el tratamiento alopático, ya que disminuye los costos por tratamiento en el intervalo parto celo y parto concepción, además mejora el porcentaje de preñez y, por lo tanto puede mejorar la rentabilidad en un hato lechero.



9. RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos se exponen las siguientes recomendaciones:

Utilizar la solución ozonificada para el tratamiento de endometritis subclínica en el periodo postparto, por presentar un mejor efecto en la disminución de polimorfonucleares frente al tratamiento alopático.

Continuar realizando investigaciones con ozono para aprovechar el potencial antimicrobiano que posee frente a los antibióticos, además que su bajo costo lo hace rentable en sistemas lecheros y no produce efecto residual en los alimentos.



10. BIBLIOGRAFÍA

Ahmadi, & Ghaisari, S. (2005). The Effect of Intrauterine Cephalixin on Treatment of Endometritis in Commercial Dairy Cattle. *Arch. Razi Ins*, 59, 35–45.

Alvear, O. (2014). *El empleo de la ozonoterapia como alternativa de tratamiento en vacas con endometritis durante el puerperio* (Tesis pregrado). Universidad de Cuenca. Ecuador.

Arbel, R., Bigun, Y., Ezra, E., Sturman, H., & Hojman, D. (2001). The effect of extended calving intervals in high-yielding lactating cows on milk production and profitability. *Journal of Dairy Science*, 84(3), 600–608. doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74513-4

Azawi, O. I. (2008). Postpartum uterine infection in cattle. *Animal Reproduction Science*, 105(3-4), 187–208. doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.01.010

Barański, W., Podhalecz-Dziegielewska, M., Zduńczyk, S., & Janowski, T. (2012). The diagnosis and prevalence of subclinical endometritis in cows evaluated by different cytologic thresholds. *Theriogenology*, 78(9), 1939–1947. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.07.018

Barlund, C. S., Carruthers, T. D., Waldner, C. L., & Palmer, C. W. (2008). A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology*, 69(6), 714–723. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.12.005

Bocci, V. (1996). Pharmacology and toxicology of ozonotherapy today. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 10(2–3), 23. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/13969020_Ozone_as_a_bioregulator_Pharmacology_and_toxicology_of_ozonotherapy_today

Bocci, V. (2005). *OZONE: A new Medical Drug*. Netherlands: Springer. Disponible en: <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

Bocci, V. A. (2006). Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Rivista Italiana Di Ossigeno-Ozonoterapia*, 5(2), 93–104. doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.08.006

Bocci, V., Borrelli, E., Travagli, V., Zanardi, I., & Scho, C. F. (2009). The Ozone Paradox: Ozone is a strong oxidant as well as a Medical Drug. *Medicinal Research Reviews*, 29(4), 646–682. doi: 10.1002/med.20150

Bogado, O., Hostens, M., Dini, P., Vandepitte, J., Ducatelle, R., & Opsomer, G. (2016). Comparison between cytology and histopathology to evaluate subclinical



endometritis in dairy cows, *Theriogenology*.
doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.014

Brett, J. a, & Meiring, R. W. (2015). Evaluating Reproductive Performance on Dairy Farms (1) *Bovine Reproduction*. Mississippi, USA: John Wiley & Sons, Inc. doi: 10.1002/9781118833971.ch41

Bromfield, J. J., Santos, J. E. P., Block, J., Williams, R. S., & Sheldon, I. M. (2015). Uterine infection: Linking infection and innate immunity with infertility in the high-producing dairy cow. *Journal of Animal Science*, 93(5), 2021–2033. doi: 10.2527/jas.2014-8496

Calderon, I., Cohen, M., Sagi-dain, L., Artzi, O., Bejar, J., Calderon, I., ... Sagi, S. (2016). The effect of ozonated sterile saline irrigation on the endometrium – A preliminary study The effect of ozonated sterile saline irrigation on the endometrium – A preliminary study. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 36(5), 635-640. <http://doi.org/10.3109/01443615.2015.1133579>

Cattaneo, L., Baudracco, J., Lazzarini, B., Ortega, H., Cattaneo, L., Baudracco, J., ... Ortega, H. (2015). Methodology to estimate the cost of delayed pregnancy for dairy cows. An example for Argentina. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 44(6), 226–229. doi: 10.3109/01443615.2015.1133579

Cho, Y., Choi, J. H., Hahn, T., & Lee, S. K. (2014). Effect of Gaseous Ozone Exposure on the Bacteria Counts and Oxidative Properties of Ground Hanwoo Beef at Refrigeration Temperature. *Korean Journal Food Science Animal Resource*. 34(4), 525–532. doi:10.5851/kosfa.2014.34.4.525

Cordova, L. (2005). *Reproducción aplicada en el ganado Bovino*. México: Trillas.

Cunningham, J., Klein, B. (2009). *Fisiología Veterinaria* (Cuarta edición). Madrid, España: Elsevier.

De Vries, A., Van Leeuwen, J., & Thatcher, W. (2010). Economics of improved reproductive performance in dairy cattle. *University of Florida*, p1–7. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Albert_De_Vries2/publication/237344377_Economics_of_Improved_Reproductive_Performance_in_Dairy_Cattle1/links/54cb373e0cf2c70ce525236a.pdf

Dhaliwal, G. S., Murray, R. D., & Woldehiwet, Z. (2001). Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. *Animal Reproduction Science*, 67(3-4), 135–152. [http://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00124-5](http://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00124-5)



Dini, P., Farhoodi, M., Hostens, M., Van Eetvelde, M., Pascottini, O. B., Fazeli, M. H., & Opsomer, G. (2015). Effect of uterine lavage on neutrophil counts in postpartum dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 158, 25–30. <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.04.005>

Djuricic, D., Vince, S., Ablondi, M., Dobranic, T., & Samardzija, M. (2012). Intrauterine ozone treatment of retained fetal membrane in Simmental cows. *Animal Reproduction Science*, 134(3-4), 119–24. <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.08.023>

Dobson-hill, B. C. (2009). *Uterine involution in the dairy cow: Comparative study between organic and conventional Dairy Cows* (Tesis de maestría). Massey University, Palmerston North, New Zeland. Disponible en: <http://mro.massey.ac.nz/bitstream/handle/10179/1272/02whole.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Dos Santos, J., & Kozicki, L. (2015). The puerperium in dairy cows : ovarian activity , uterine involution and follicular dynamics. *Rev. Acad. Cienc. Anim*, (January). Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/283459420_The_puerperium_in_dairy_cows_ovarian_activity_uterine_involution_and_follicular_dynamics

Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S., & LeBlanc, S. J. (2010). Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93(11), 5225–5233. <http://doi.org/10.3168/jds.2010-3428>

Đuričić, D., Valpotić, H., & Samardžija, M. (2015). Prophylaxis and therapeutic potential of ozone in buiatrics: Current knowledge. *Animal Reproduction Science*, 159, 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.05.017>

Elvis, A., & Ekta, J. (2011). Ozone therapy: A clinical review. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 2(1), 66. <http://doi.org/10.4103/0976-9668.82319>

The European Agencyfor the Evaluation of Medicinals Products (2001). Veterinary Medicines and Information Technology "CEFAPIRIN". Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500011777.pdf

Freire, R. (2011). *Tratamiento profiláctico con Ozono y Lidocaína al 0.5% intrauterino en las primeras doce horas posparto sobre las infecciones uterinas en ganado lechero en Zamorano* (Tesis de pregrado). Universidad Zamorano. Tegucigalpa, Honduras. Disponible en: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/344/1/T3094.pdf>

García, M. E., Peña, A. I., Díaz, C., Barrio, M., & Herradón, J. J. B. P. G. (2003). Después del parto , las hembras bo- reproductiva para poder gestar nueva- rápido



restablecimiento de la actividad para poder soportar una nueva gestación va a afectar de forma negativa al posterior rendimiento reproductivo del animal incrementando el in, 419–429.

García, M. E., Quintela, L. a, Taboada, M. J., Alonso, G., Varela, B., Díaz, M., ... Herradón, P. G. (2004). Factores de riesgo de la metritis en vacas lecheras: estudio retrospectivo en el noroeste de España. *Redalyc* 53(204), 383–386. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49520407>

Gautam, G., Nakao, T., Koike, K., Long, S. T., Yusuf, M., Ranasinghe & Hayashi, A. (2010). Spontaneous recovery or persistence of postpartum endometritis and risk factors for its persistence in Holstein cows. *Theriogenology* 73, 168–179. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.08.010>

Giuliodori, M. J., Magnasco, R. P., Becu-Villalobos, D., Lacau-Mengido, I. M., Risco, C. a, & de la Sota, R. L. (2013). Clinical endometritis in an Argentinean herd of dairy cows: risk factors and reproductive efficiency. *Journal of Dairy Science*, 96(1), 210–8. <http://doi.org/10.3168/jds.2012-5682>

González-Stagnaro, C. (2001). Parámetros, cálculos e índices aplicados en la evaluación de la eficiencia reproductiva. *Reproducción Bovina* (pp. 203–247). Fundación Girarz. Edic. Astro Data S.A. Disponible en: http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/libro_reproduccionbovina/cap14.PDF

Gröhn, Y. T., & Rajala-Schultz, P. J. (2000). Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 605–614. [http://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00085-3](http://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00085-3)

Hartmann, D., Rohkohl, J., Merbach, S., Heilkenbrinker, T., Klindworth, H. P., Schoon, H. a., & Hoedemaker, M. (2016). Prevalence of cervicitis in dairy cows and its effect on reproduction. *Theriogenology*, 85(2), 247–253. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.029>

Heppelmann, M., Brömmeling, a., Weinert, M., Piechotta, M., Wrenzycki, C., & Bollwein, H. (2013). Effect of postpartum suppression of ovulation on uterine involution in dairy cows. *Theriogenology*, 80(5), 519–525. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.05.017>

Irish Medicine Board. (2012). Summary of Product Characteristics "cephapirin", 12–15. Disponible en: https://www.hpra.ie/img/uploaded/swedocuments/LicenseSPC_10996-053-001_14122012145617.pdf



Kaçar, C., & Kaya, S. (2014). Uterine infections in cows and effect on reproductive performance. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 20(6), 975–982. <http://doi.org/10.9775/kvfd.2014.11370>

Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. a., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S., & Johnson, W. H. (2004). Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 62(1-2), 9–23. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.03.001>

Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. a., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S., & Johnson, W. H. (2005). A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Canadian Veterinary Journal*, 46(3), 255–259. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1082871/>

Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. a., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S., & Johnson, W. H. (2005). The effect of a single administration of cephalixin or cloprostenol on the reproductive performance of dairy cows with subclinical endometritis. *Theriogenology*, 63(3), 818–830. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.002>

Larinna, A., Bocci, V., & Carlo, A. (2015). OZONE AS A MODULATOR OF THE IMMUNE. Siena, Italia. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/237666795_OZONE_AS_A_MODULATOR_OF_THE_IMMUNE_SYSTEM

LeBlanc, S. J. (2008). Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: A review. *Veterinary Journal*, 176(1), 102–114. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.019>

LeBlanc, S. J., Osawa, T., & Dubuc, J. (2011). Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 76(9), 1610–1618. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.017>

Lewis, G. S. (2004). Steroidal regulation of uterine immune defenses. *Animal Reproduction Science*, 82-83(2004), 281–294. <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.026>

Löf, E. (2012). *Epidemiological Studies of Reproductive Performance Indicators in Swedish Dairy Cows* (Tesis Doctoral). Swedish University of Agricultural Sciences. Upsala, Suecia. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/11698083.pdf>

Lucy, M. C. (2001). Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *Journal of Dairy Science*, 84(6), 1277–1293. [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70158-0](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70158-0)



Madoz, L. V. (2012). *Endometritis subclínica en vacas de tambo: diagnóstico, prevalencia e impacto sobre la eficiencia reproductiva* (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina. Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/18570/Documento_completo____.pdf?sequence=3

Menéndez. S, González. R, Ledea. O, Hernández. F, León. Olga, D. M. (2008). El ozono: aspectos basicos y sus aplicaciones clinicas, 1–9. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Oscar_Ernesto_Ledea_Lozano/publication/260834437_El_Ozono_Aspectos_Basicos_y_sus_Aplicaciones_Clinicas/links/0deec5330b2fc9c9d2000000.pdf

Méo, Simone.; Yamasaki, W. (2000). Fisiologia do Parto.

Narváez, J., & Lazo, H. (2008). *Morfología ecográfica de los ovarios y cuernos uterinos en vacas Holstein Friesian en periodo puerperal* (Tesis de maestría). Universidad de Cuenca.

Nogueira, C., Maia, L., Landim, F., & Oba, E. (2014). *CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO PÓS-PARTO EM BOVINOS*. Veterinária e Zootecnia, 21(1). Disponible en: <http://www.fmvz.unesp.br/rvz/index.php/rvz/article/view/418/514>

Ohtsuka, H., Ogata, A., Terasaki, N., Koiwa, M., & Kawamura, S. (2006). Changes in leukocyte population after ozonated autohemoadministration in cows with inflammatory diseases. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 68(2), 175–178. <http://doi.org/10.1292/jvms.68.175>

Peter, D. C., Satu, P., and Geoffrey, W. S. (2008). Guildeline for antimicrobial use in cattle. *Veterinary Pharmacology, Toxicology & Therapeutics*, 143–160. DOI: 10.1002/9781444302639.ch9

Plöntzke, J., Madoz, L. V, De la Sota, R. L., Drillich, M., & Heuwieser, W. (2010). Subclinical endometritis and its impact on reproductive performance in grazing dairy cattle in Argentina. *Animal Reproduction Science*, 122(1-2), 52–7. <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.07.006>

Plumb, D. (2010). *Manual de Farmacologia Veterinaria* (Sexta). Buenos Aires, Argentina: Intermedica.

Polat, B., Cengiz, M., Cannazik, O., Colak, a., Oruc, E., Altun, S., ... Bastan, A. (2015). Endometrial echotexture variables in postpartum cows with subclinical endometritis. *Animal Reproduction Science*, 155, 50–55. <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.01.015>



Polat, B., Cengiz, M., Çolak, A., & Cannasik, O. (2015). Subklini Endometritisli İneklerde İntrauterin Ozon ve Rifaksimın Tedavisinin Karşılaştırılması. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21(5), 773–776. <http://doi.org/10.9775/kvfd.2015.13690>

Pryce, J. E., & Veerkamp, R. F. (2001). The incorporation of fertility indices in genetic improvement programmes. *British Society of Animal Science*, (October), 29–30. Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=NL2012029987>

Purohit, G. N., Ruhil, S., & Khichar, V. (2015). Postpartum endometritis in dairy cows : current status of diagnosis , therapy and prevention, 5(1), 1–23. doi:10.5958/2277-3371.2015.00001.7

Runciman, D. J., Anderson, G. a., Malmo, J., & Davis, G. M. (2008). Effect of intrauterine treatment with cephalirin on the reproductive performance of seasonally calving dairy cows at risk of endometritis following periparturient disease. *Australian Veterinary Journal*, 86(7), 250–258. <http://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2008.00302.x>

Rutter, B. (2002). Puerperio bovino. *Producción Animal*, 1–13. Disponible en: http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/cria/58-puerperio_bovino.pdf

Rutter, B. (2013). Diagnostico de endometritis subclínica en vacas lecheras. 1er Congreso internacional de producción animal especializada en bovinos. Disponible en: <https://www.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/download/655/572>

Schwartz, A., Martínez-Sánchez, G., & Scwhartz, A. (2012). La ozonoterapia y su fundamentación científica. *Revista Española de Ozonoterapia*, 2(1), 163–198. Disponible en: <http://revistaespaoladeozonoterapia.es/index.php/reo/article/view/23>

Shalloo, L., Cromie, a, & McHugh, N. (2014). Effect of fertility on the economics of pasture-based dairy systems. *Animal : An International Journal of Animal Bioscience*, 8(1), 222–31. <http://doi.org/10.1017/S1751731114000615>

Sheldon, I. M. (2004). The postpartum uterus. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 20(3 SPEC. ISS.), 569–591. <http://doi.org/10.1016/j.cvfa.2004.06.008>

Sheldon, I. M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio, G., & Schuberth, H.-J. (2009). Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biology of Reproduction*, 81(6), 1025–1032. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077370>

Sheldon, I. M., & Dobson, H. (2004). Postpartum uterine health in cattle. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 295–306. <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.006>



Sheldon, I. M., Lewis, G. S., LeBlanc, S., & Gilbert, R. O. (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, 65(8), 1516–1530. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.021>

Sheldon, M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio, G., & Schuberth, H. (2009). Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biology of Reproduction*, 81(6), 1025–1032. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077370>

Singh, J., Murray, R. D., Mshelia, G., & Woldehiwet, Z. (2008). The immune status of the bovine uterus during the peripartum period. *Veterinary Journal*, 175(3), 301–309. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.02.003>

Smith, B. (2009). *LARGE ANIMAL INTERNAL MEDICINE* (4ed ed.). St. Louis, Missouri: Mosby, Inc.

Streyl, D., Bromfield, J. J., Miyamoto, A., & Fergani, C. (2014). Immunity and inflammation in reproduction. *Reproduction Advance*, (June), 1–37. doi: 10.1530/REP-14-0163

Thomé, H. E., Arruda, R. P. De, Marcele, B., Oliveira, M. De, Filho, M. M., Oliveira, G. C. De, ... Celeghini, C. (2016). Uterine lavage is efficient to recover endometrial cytology sample and not interfere with fertility rate after artificial insemination in cows. *Theriogenology*. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.014>

Thomson, M. (2003). Veterinary Pharmacology and Therapeutics. *Journal of Veterinary and Therapeutics*, 26(2), 280. <http://doi.org/10.1034/j.1600-051X.26.s2.1.x>

Vanina, L., & Luzbel de la Sota, R. (2012). *Endometritis Subclinica en vacas de tambo: diagnóstico, prevalencia e impacto sobre la eficiencia reproductiva*. *Asociación Peruana de Reproducción Animal*. 4(2): 105 - 111. Disponible en: http://spermova.pe/site2/files/Revistas/Rev.No.4%20Vol.2/1_Sota_2014-II-105-111.pdf

Walsh, S. W., Williams, E. J., & Evans, a. C. O. (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 123(3-4), 127–138. <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.12.001>

Wattiaux, M. (1999). *Esenciales Lecheras* (p. 139). Madison, Wisconsin: Instituto Babcock.

Yusuf, M., Nakao, T., Ranasinghe, R. B. K., Gautam, G., Long, S. T., Yoshida, C., ... Hayashi, A. (2010). Reproductive performance of repeat breeders in dairy herds. *Theriogenology*, 73(9), 1220–1229. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.01.016>



Zamora, Z. (2015). Utilidad potencial de la Ozonoterapia en la medicina veterinaria. *Revista electrónica de Veterinaria*. 10(10) 1-13. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101009/100909.pdf>

Zhang, Y. Q., Wu, Q. P., Zhang, J. M., & Yang, X. H. (2011). Effects of ozone on membrane permeability and ultrastructure in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*, 111(4) 1006–1015. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05113.x>

Zobel, R., Martinec, R., Ivanovi, D., Roši, N., Stan, Z., Žerjavi, I., ... Smolec, O. (2014). Intrauterine ozone administration for improving fertility rate in Simmental cattle. *Veterinarski Arhiv* 84(1), 1–8. Disponible en: <http://www-staro.vet.unizg.hr/vetarhiv/papers/2014-84-1-1.pdf>

11. ANEXOS

Anexo 1 Cronograma de actividades

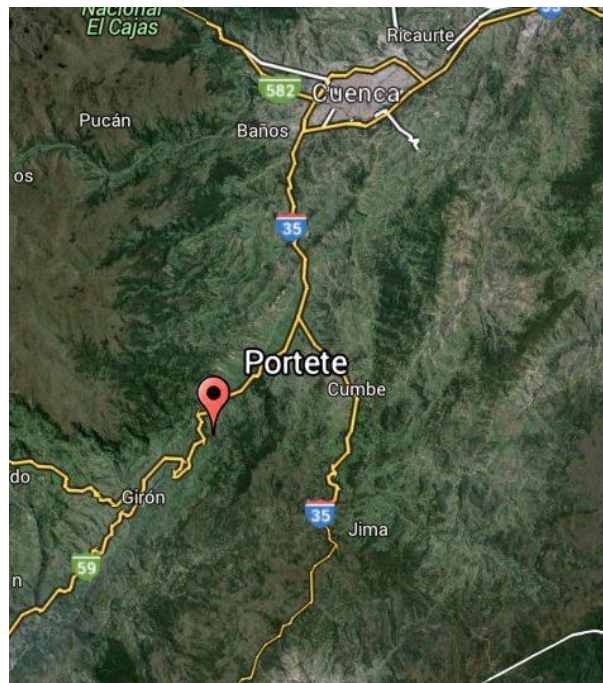
Actividad	Mes									
	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov
Selección de animales										
Diagnóstico de Endometritis subclínica por citología endometrial										
Evaluación de los tratamientos por citología endometrial										
Envío de muestras al Facultad de Ciencias Médicas										
Diagnóstico de preñez 60 días después del primer servicio										

Anexo 2 Ubicación de las granjas

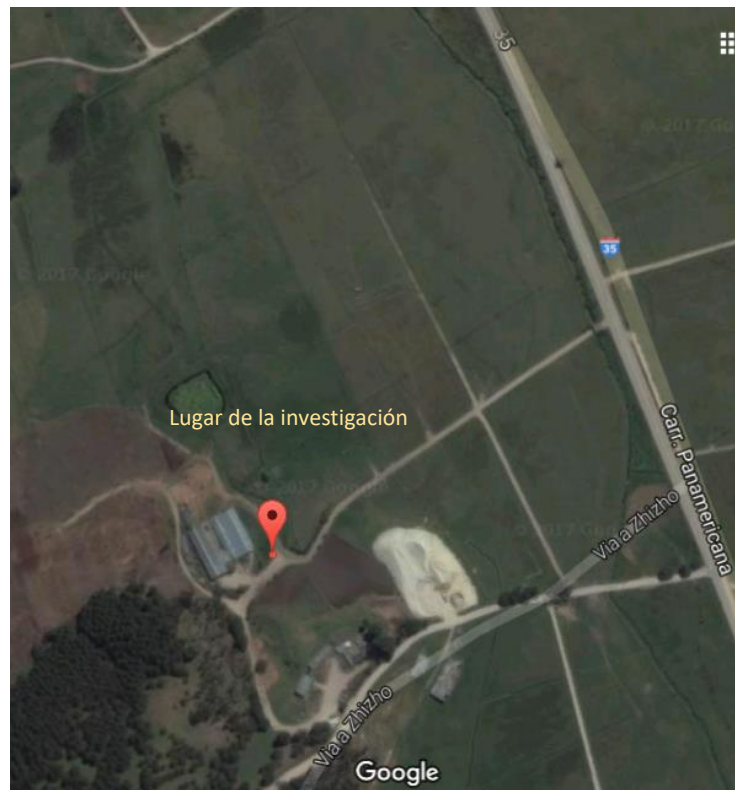


Ubicación de la granja Nero

Fuente: Google Earth.



Ubicación Granja Irquis
Fuente: Google Earth.



Ubicación de la Hacienda Cumbesa
Fuente: Google Maps.

Anexo 3 Evaluación del anillo de Burdi



Anexo 4 Citología endometrial mediante la técnica de cytobrush



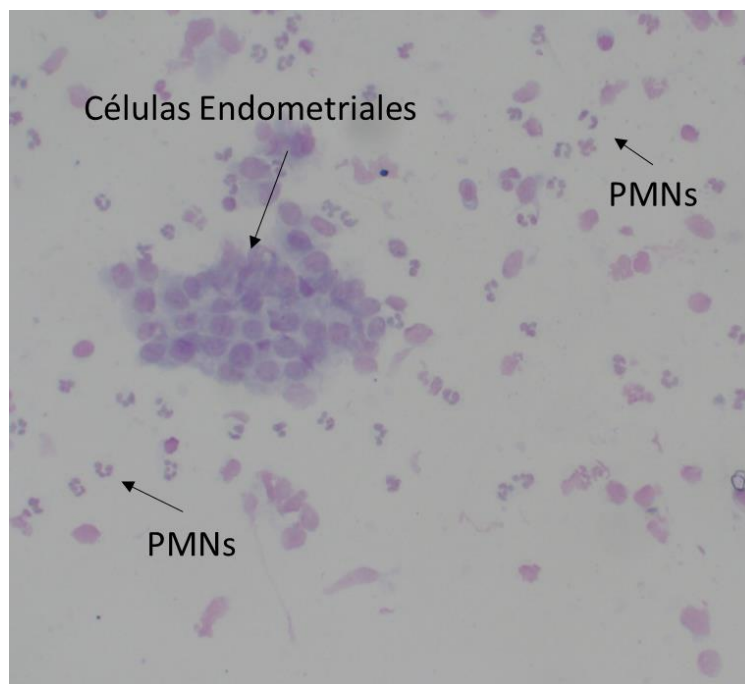
Anexo 5 Tinción de Giemsa modificado



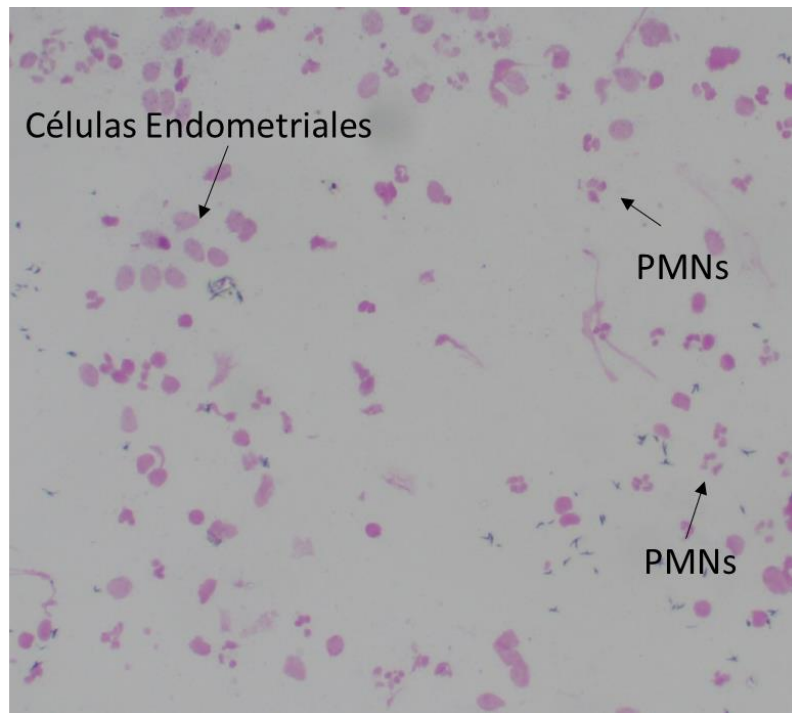


CONTEO DE CÉLULAS PMN (%)

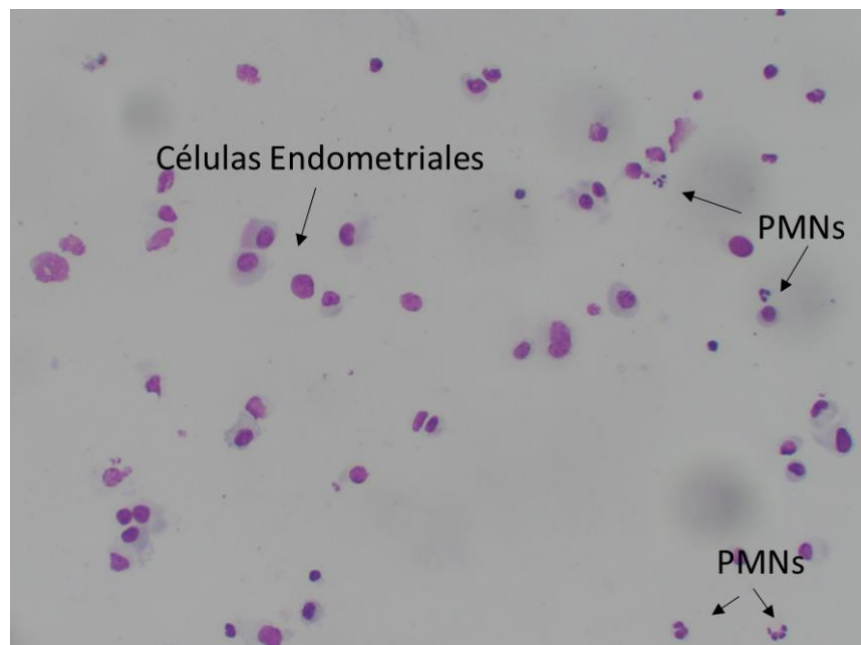
Anexo 7 Evaluación de PMNs de las placas citología endometrial



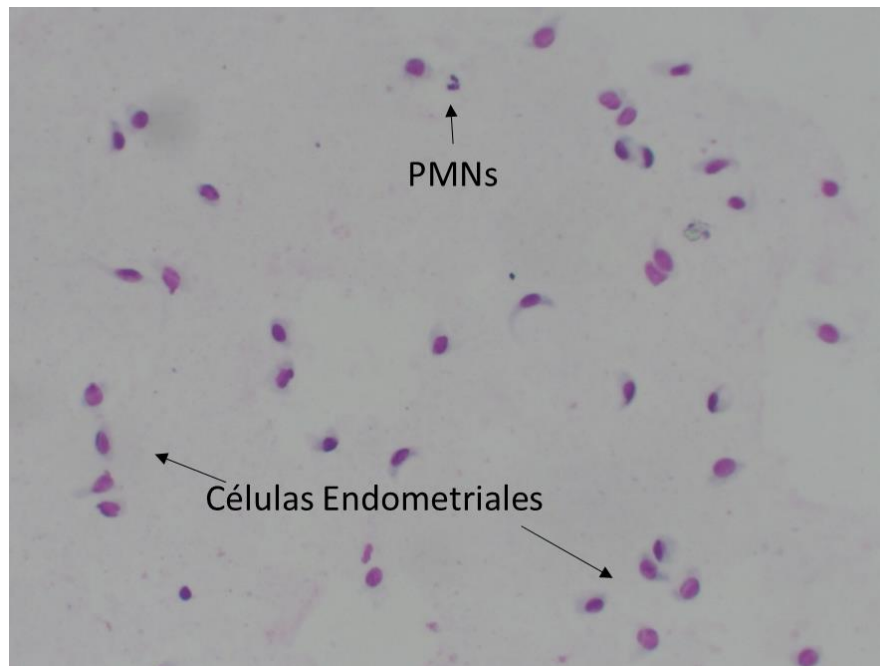
Citología Endometrial: Granja NERO, Vaca 430, Diagnóstico (+) 39% PMNs



Citología Endometrial: Granja Irquis Vaca 410, Diagnóstico (+) 23% PMNs

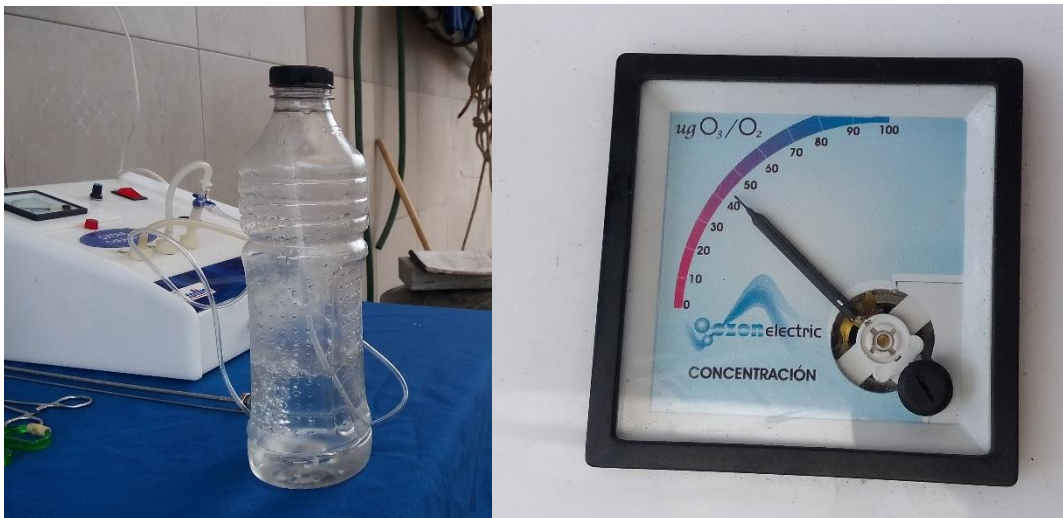


Citología Endometrial: Granja Irquis, Vaca 430, Tratamiento cefapirina benzatínica,
9% PMNs



Citología Endometrial: Granja Nero, Vaca 410, Tratamiento Ozono, 1% PMNs

Anexo 8 Preparación de la solución ozonificada y aplicación de los tratamientos







Anexo 9 Promedio de la variable del número de partos

Tratamiento	Media	Error estándar	Coeficiente de Variación
1	2,6	0,13	27,85
2	2,8	0,18	36,81
3	2,6	0,18	38,59

Anexo 10 Promedio de la variable de los días postparto

Tratamiento	Media	Error estándar	Coeficiente de Variación
1	40,97	0,834	11,15
2	40,43	0,833	11,28
3	40,6	0,77	10,38

Anexo 11 Promedio de la variable de anillo de burdi

Tratamiento	Media	Error estándar	Coeficiente de Variación
1	3,57	0,171	26,22
2	3,63	0,162	24,49
3	3,7	0,16	23,7

Anexo 12 Promedio de la variable condición corporal

Tratamiento	Media	Error estándar	Coeficiente de Variación
1	2,7	0,04	11,15
2	2,71	0,04	11,28
3	2,74	0,03	6,55

Anexo 13 Promedios de la variable polimorfonucleares entre los 34 a 37 días postparto

	Efecto	TX	Estimación	Error estándar	DF	t Valor	Pr > t	Mu
1	TX	1	2,783	0,08538	86	32,6	<,0001	16,166
2	TX	2	2,7169	0,08825	86	30,7	<,0001	15,133
3	TX	3	1,2238	0,1862	86	6,57	<,0001	3,4



Anexo 14 Diferencias de mínimos cuadrados – polimorfonucleares 72 horas post-tratamiento

Efecto	TX	TX	Estimado	Mu	Error estándar	DF	Valor T	Pr > t	Ajuste	P ajustado
TX	1	2	0,6721	6,26	0,03653	86	10,7	<.0001	Tukey-Kramer	<,0001
TX	1	3	0,7705	3,2	0,05112	86	11,86	<.0001	Tukey-Kramer	<,0001
TX	2	3	0,0984	2,9	0,0537	86	1,33	0.1877	Tukey-Kramer	0,3837

Anexo 15 Pruebas de correlación de pearson de la variable días postparto vs. Polimornucleares pretratamiento

Coeficiente de correlación de Pearson, N=90
Prob> |r| bajo H0: Rho = 0

	DPOSTP	PMNs
DPOSTP	1,000000	-0,22366
DPOSTP		0,0341
PMN Iniciales	-0,22366	1,000000
PMN Iniciales	0,0341	

Anexo 16 Pruebas de correlación de pearson de la variable condicion corporal vs. Polimornucleares pretratamiento

Coeficiente de correlación de Pearson, N=90
Prob> |r| bajo H0: Rho = 0

	CC	PMNs
DPOSTP	1,000000	0,04607
DPOSTP		0,6663
BURDI	0,04607	1,000000
BURDI	0,6663	



Anexo 17 Pruebas de correlación de pearson de la variable anillo de Burdi vs. Polimornucleares pretratamiento

Coefficiente de correlación de Pearson, N=90
Prob> |r| bajo H0: Rho = 0

	BURDI	PMNs
DPOSTP	1,000000	-0,04096
DPOSTP		0,7015
BURDI	-0,04096	1,000000
BURDI	0,7015	

Anexo 18 Diferencias de mínimos cuadrados – Intervalo parto celo

Efecto	TX	TX	Estimado	Mu	Error estándar	DF	Valor T	Pr > t	Ajuste	P ajustado
TX	1	2	0,05564	94,2	0,06448	86	0,60	0,549	Tukey-Kramer	0,8196
TX	1	3	0,1071	89,1	0,0663	86	1,14	0,2565	Tukey-Kramer	0,491
TX	2	3	0,05141	84,7	0,06802	86	0,54	0,5897	Tukey-Kramer	0,8512

Anexo 19 Diferencias de mínimos cuadrados – Intervalo parto concepción

Efecto	TX	TX	Estimado	Mu	Error estándar	DF	Valor T	Pr > t	Ajuste	P ajustado
TX	1	2	0,08852	105	0,05942	86	1,13	0,2667	Tukey-Kramer	0,5035
TX	1	3	0,05737	96,3	0,05138	86	0,64	0,5237	Tukey-Kramer	0,7971
TX	2	3	-0,03115	99,4	0,06648	86	-0,37	0,7128	Tukey-Kramer	0,9272

Anexo 20 Diferencias de mínimos cuadrados – porcentaje de preñez

Efecto	TX	TX	Estimado	Mu	Error estándar	DF	Valor T	Pr > t	Ajuste	P ajustado
TX	1	2	-0,3795	43,3	0,2039	86	-1,43	0,1551	Tukey-Kramer	0,3279
TX	1	3	0,1671	63,3	0,1686	86	0,55	0,5805	Tukey-Kramer	0,8443
TX	2	3	0,5465	36,7	0,2216	86	1,96	0,0529	Tukey-Kramer	0,1277



Anexo 21 Plantilla de registro de la hoja de campo para el muestreo de citología endometrial

MUESTREO PARA CITOLOGÍA ENDOMETRIAL "CYTOBRUSH" Y TRATAMIENTO ALOPATICO Y OZONO INTRAUTERINO

N°	N° ARETE	LUGAR	FECHA 2016	N° DE PARTOS	N° DIAS POST PARTO	ANILLO DE BURDI	CONDICIÓN CORPORAL (1-5)	DX ENTRE 34 - 47 DIAS POSTPARTO %PMIN	TRATAMIENTO	FECHA DE APLICACIÓN DE TRATAMIENTO	EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS % PMIN A LAS 72 HORAS	OBSERVACIONES
1	365	NEBO	06/02/16	2	34	4	3	38	OZONO	07/02/16	7	
2	401	NEBO	16/02/16	3	34	5	2,75	1	TESTIGO	—	—	
3	420	IRAGUIS	17/03/16	2	34	4	3	15	CEFAPIRINA	18/03/16	6	
4	392	NEBO	06/02/16	2	40	3	3	6	TESTIGO	—	—	
5	395	NEBO	04/03/16	2	38	2	2,75	18	CEFAPIRINA	02/03/16	2	
6	513	IRAGUIS	07/04/16	2	40	3	2,5	14	OZONO	08/04/16	5	
7	501	IRAGUIS	13/05/16	2	34	3	2,5	23	CEFAPIRINA	14/05/16	11	
8	559	COMBESA	18/06/16	2	35	3	3	13	OZONO	19/06/16	1	
9	283	COMBESA	17/06/16	4	36	3	2,75	4	TESTIGO	—	—	
10	416	COMBESA	18/06/16	6	38	4	2,75	10	OZONO	19/06/16	3	
11	425	NEBO	01/07/16	2	43	3	2,5	19	CEFAPIRINA	02/07/16	11	



Anexo 22 Plantilla de registro de la hoja de campo para el diagnóstico de preñez

DÍAS ABIERTOS Y DIAGNÓSTICO DE PREÑEZ

N°	N° DE ARETE	LUGAR	FECHA DE PARTO	DÍAS ABIERTOS 1 ^{ER} CELO	FECHA 1 ^{ER} SERVICIO	DIAGNÓSTICO DE PREÑEZ (40 días)	DÍAS ABIERTOS PARTO-CONCEPCIÓN.	OBSERVACIONES
1	653	CHIBESA	15/05/16	79	02/05/16	POSITIVO	79	
2	513	TEQUIS	27/02/16	49	16/04/16	POSITIVO	49	
3	234	NERO	01/03/16	65	08/07/16	NEGATIVO	—	
4	381	NERO	04/06/16	146	28/10/16	POSITIVO	146	
5	391	NERO	15/05/16	121	13/09/16	NEGATIVA	—	
6	351	TEQUIS	10/06/16	61	10/08/16	POSITIVO	61	
7	523	TEQUIS	05/07/16	61	04/09/16	NEGATIVO	—	
8	343	TEQUIS	06/01/16	117	28/06/16	POSITIVO	117	
9	486	CHIBESA	23/04/16	128	19/09/16	NEGATIVO	—	
10	571	CHIBESA	06/05/16	109	23/08/16	NEGATIVO	—	
11	519	CHIBESA	25/04/16	120	19/09/16	POSITIVO	120.	



Anexo 23 Plantilla de registro de la hoja de laboratorio para la evaluación de PMNs

CONTEO DE CÉLULAS %PMN OBTENIDAS POR LA TÉCNICA DE "CYTOBRUSH"

FECHA	N°	N° DE ARETE	EVALUACIÓN 1.				EVALUACIÓN 2				DX ES	FECHA	EVALUACIÓN POST TRATAMIENTO		
			% CÉLULAS PMN				% CÉLULAS PMN						% CÉLULAS PMN		
			1 ^{RA} LECTURA	2 ^{DA} LECTURA	Xm	Xm	1 ^{RA} LECTURA	2 ^{DA} LECTURA	Xm	Xm			1 ^{RA} LECTURA	2 ^{DA} LECTURA	Xm
22/02/16	1	508	2	3	3	4	3	4	4	NEGATIVO	—	—	—	—	
22/02/16	2	388	38	39	39	32	30	33	32	POSITIVO	27/02/16	16	20	18	
17/03/16	3	420	12	17	15	15	17	12	15	POSITIVO	23/03/16	7	6	7	
07/04/16	4	513	11	12	12	16	16	16	16	POSITIVO	12/04/16	6	3	5	
13/05/16	5	384	0	1	1	1	1	0	1	NEGATIVO	—	—	—	—	
17/05/16	6	178	12	10	11	10	11	9	10	POSITIVO	22/05/16	1	2	2	
06/06/16	7	1266	0	1	1	1	0	1	1	NEGATIVO	—	—	—	—	
06/06/16	8	529	3	2	3	3	2	3	3	NEGATIVO	—	—	—	—	
06/08/16	9	319	0	0	0	1	1	0	1	NEGATIVO	—	—	—	—	
30/08/16	10	413	3	7	5	7	7	6	7	NEGATIVO	—	—	—	—	
30/08/16	11	1218	33	29	32	27	27	30	29	POSITIVO	04/09/16	4	5	5	

**Anexo 24** Datos y fórmulas para el cálculo del intervalo parto concepción

DATOS	
ITEM	PROMEDIO
Promedio producción de leche por día	14,20
Promedio de producción de leche promedio por DAI	9,28
Precio de leche	0,45
Valor ternera	433,33
Valor ternero	72,68
Costo por inseminación/frecuencia	27,15
Costo servicios veterinarios extras/frecuencia	0,04
Otros	0,45
% descarte por infertilidad	6,68
Precio de vaca de remplazo	1833,33
Precio de vaca de descarte	280,24
Costo de Alimentación/día	0,31
Costo labor de detección de celo/día	1,32
Intervalo interparto deseado (días)	375
Frecuencia	50

DAI= Días abiertos involuntarios

Pérdidas en leche por lactancia extendida

$$PL = (\bar{X} \text{ producción leche} - \bar{X} \text{ producción leche lactancia extendida}) \times \text{precio leche}$$

Pérdidas por ternero no nacido

$$PTnN = \frac{(\text{Valor ternera} - \text{Valor ternero})}{\text{Intervalo Interparto deseado}}$$

Intervenciones reproductivas extras

$$IR = \frac{(\text{Costo IA} + \text{costos servicios veterinarios extras})}{\text{Frecuencia (días)}}$$

Descarte por infertilidad

$$DI = \frac{(\% \text{ Descarte} \times (\text{Precio vaca remplazo} - \text{Precio Vaca descarte}))}{\text{Días Abiertos Involuntarios}}$$